



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0067076
(43) 공개일자 2024년05월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7010183
(22) 출원일자(국제) 2022년09월21일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/076268
(87) 국제공개번호 WO 2023/046777
국제공개일자 2023년03월30일
- (30) 우선권주장
21306310.0 2021년09월22일
유럽특허청(EPO)(EP)
22305050.1 2022년01월18일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
바이오인벤트 인터내셔널 에이비
스웨덴, 룬드 223 70, 이데온가탄 1
트랜스진
프랑스, 에프-67400 일키르치 그라펜스타텐, 블러
바드 곤디어 디 '안테르나치, 파르크 디 '이노베
이션
- (72) 발명자
프렌데우스, 비요른
스웨덴, 룬드 에스이-224 68, 테노그렌덴 1
렌, 마틸다
스웨덴, 말뫼 에스이-212 13, 뢰벨스다탄 3에이
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인씨엔에스

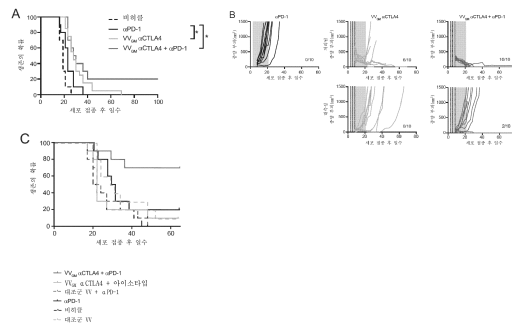
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 항체의 신규 조합 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및 PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자의 조합 및 암의 치료에서 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)

C12N 7/00 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2039/5256 (2013.01)

C12N 2710/24132 (2013.01)

C12N 2710/24143 (2013.01)

(72) 발명자

셈리치, 모니카

스웨덴, 말뫼 에스이-215 67, 그린달스그랜드 1

마르텐손, 린다

스웨덴, 비자레드 에스이-237 91, 프젤리 릴레비베

그 8

마샬드, 진-바프티스트

프랑스, 오베르네 67210, 뤼 데스 하우스 파튀라주
1에이

명세서

청구범위

청구항 1

환자에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 조합으로서,

- CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및
- PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 포함하며,

상기 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는, 조합.

청구항 2

환자에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 용도로서,

- CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및
- PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자의 용도로서,

상기 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는, 용도.

청구항 3

환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 방법은,

- CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및
- PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스로서,

PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자와 조합하여 사용하기 위한 종양용해성 바이러스이고;

환자의 암을 치료하기 위한 종양용해성 바이러스이며, 상기 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는, 종양용해성 바이러스.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차가운 종양은 상기 제1 및 제2 항체 분자에 의해 치료되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 상기 항체 분자는 Fc γ 수용체 결합 항체인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 상기 항체 분자는 Treg 고갈 항체인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 종양용해성 수두 바이러스인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 수두 바이러스는 코르도포스비리대(Chordopoxviridae) 서브패밀리, 보다 바람직하게는 백시니아 바이러스(vaccinia virus), 우두 바이러스(cowpox virus), 카나리아두 바이러스(canarypox virus), 엑트로멜리아 바이러스(ectromelia virus) 및 점액종 바이러스(myxoma)로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택되는 오르토폭스바이러스 속(Orthopoxvirus genus)에 속하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 티미딘 키나제(thymidine kinase: TK) 활성 및/또는 리보뉴클레오티드 리덕타제(ribonucleotide reductase: RR) 활성에 결함이 있고, 서열번호 20 및 서열번호 21 또는 서열번호 53 및 서열번호 54를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백시니아 바이러스인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 인간 GM-CSF(예를 들어, 서열번호 55 또는 서열번호 56을 가짐) 또는 뮤린 GM-CSF(예를 들어, 서열번호 57 또는 서열번호 58을 가짐)에 대해서 특이적 선호도를 갖는, GM-CSF를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스는 바이러스 J2R 유전자좌에 삽입된 제1 항체 분자의 중쇄를 인코딩하고/하거나 바이러스 I4L 유전자좌에 삽입된 제1 항체 분자의 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 서열 번호 3, 6, 8, 10, 12 및 14로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 중 1 내지 6개를 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, 및 VL-CDR3의 CDR 중 1 내지 6개를 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택되며,

- 여기서 VH-CDR1은, 존재하는 경우, 서열번호 15, 22, 29 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- 여기서 VH-CDR2는, 존재하는 경우, 서열번호 16, 23, 30 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- 여기서 VH-CDR3는, 존재하는 경우, 서열번호 17, 24, 31 및 37으로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- 여기서 VL-CDR1은, 존재하는 경우, 서열번호 10 및 38로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- 여기서 VL-CDR2는, 존재하는 경우, 서열번호 18, 25, 32 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- 여기서 VL-CDR3는, 존재하는 경우, 서열번호 19, 26 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 서열번호 15, 16, 17, 10, 18 및 19를 갖는 6개의 CDR, 또는 서열번호 22, 23, 24, 10, 25 및 26을 갖는 6개의 CDR을 포함하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 서열번호 20 및 27로 이루어진 군으로부터

선택되는 가변 중쇄 및/또는 서열번호 21 및 28로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄를 포함하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 중쇄 불변 영역 서열번호 43 및/또는 경쇄 불변 영역 서열번호 44를 포함하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 이필리무맙 및 트레멜리무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1항체 분자는 제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 분자와 CTLA-4에 대한 결합 경쟁이 가능한 항체 분자인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항체 분자는 전체-크기 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, Fab, Fv, scFv, Fab' 및 (Fab')₂로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항체 분자는 인간 IgG 항체, 인간화 IgG 항체 및 인간 기원의 IgG 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스는 제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 제1 항체 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 45 내지 52로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항체 분자는 인간 항체 분자, 인간화 항체 분자, 및 인간 기원의 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항체 분자는 단일클론 항체 분자 또는 단일클론 기원의 항체 분자인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항체 분자는 전체-크기 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 및 이의 항원-결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항체 분자는 인간 IgG 항체, 인간화 IgG 항체 분자 또는 인간 기원의 IgG 항체 분자인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항체 분자는 PD1에 특이적으로 결합하고, 펌브롤리주맵(pembrolizumab); 니볼루맵(nivolumab); 세미플리맵(cemiplimab); 캄렐리주맵(camrelizumab); 스파르탈리주맵(spartalizumab); 도스타리맵(dostarlimab); 티슬렐리주맵(tislelizumab); JTX-4014; 신틸리맵(sintilimab)(IBI308); 토리파리맵(toripalimab)(JS 001); AMP-224; 및 AMP-514(MEDI0680)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항체 분자는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 아테졸리주맵(atezolizumab); 두르발루맵(durvalumab); 아벨루맵(avelumab); CS1001; KN035(엔바폴리맵(envafolimab)); 및 CK-301로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 제1 항체 분자.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차가운 종양은 면역-사멸된 종양; 및/또는 면역-배제된 종양; 및/또는 면역 침윤이 불량한 종양인, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차가운 종양은 흑색종; 췌장암; 전립선암; 대장암; 간세포 암종; 폐암; 방광암; 신장암; 위암; 자궁경부암; 메르켈 세포 암종; 난소암, 두경부암; 중피종; 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있거나; PD1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있거나; PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있거나; CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있거나; PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있거나; CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 하는 치료에 내성이 있는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자, 및/또는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자로 이전에 치료되었으며, 여기서 상기 환자는 치료 후에 치료에 내성이 있거나 치료 동안 치료에 내성이 있게 되는, 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

청구항 35

첨부된 단락, 청구범위, 설명, 실시예 및 도면을 참조하여 실질적으로 본원에 청구된 바와 같은 사용을 위한 조합, 또는 용도, 또는 방법, 또는 사용을 위한 종양용해성 바이러스.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 (i) CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; (ii) PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 포함하는 조합에 관한 것으로, 여기서 조합은 환자의 차가운 종양(cold tumor)을 포함하거나 이로 구성되는 암의 치료에 사용하기 위한 것이다. 본 발명은 또한 환자의 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는 암 치료용 약제의 제조에 있어서의 상기 조합의 사용, 및 상기 조합을 투여하는 것을 포함하는 환자의 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는 암 치료 방법에 관한 것이다.
- [0002] 면역 체크포인트 차단 항체를 사용한 치료는 전이성 흑색종, 비소세포 폐암, 불일치-복구 결핍 암을 포함하는 진행성 고형암 환자의 생존을 변화시켰다(문헌[Hodi et al., 2010; Larkin et al., 2015; Topalian et al., 2012]).
- [0003] 그러나, 많은 환자가 면역 체크포인트 차단(ICB)에 반응하지 못하거나 내성을 획득하지 못하기 때문에 여전히 충족되지 않은 큰 요구가 남아 있다(문헌[Sharma et al., 2017]). 효능이 부족한 이유는 면역세포(TIL), 특히 CD8⁺ T 세포가 침윤하는 종양이 부족하거나 불충분함을 포함하는 것으로 여겨진다(문헌[Chen and Mellman, 2013; Gajewski et al., 2013]). 고형암 종양 미세환경(TME)에서 화학주성 및 염증 신호의 발전도는 CAR-T 세포 요법에 대한 저항성을 뒷받침하는 것으로 유사하게 생각된다(문헌[Wagner et al., 2020]).
- [0004] 따라서 염증성 면역 세포를 “면역 사막(immune desert)” 또는 “면역 배제(immune excluded)” 종양으로 모집하도록 유도하는 치료제의 식별이 매우 필요하며, 이는 1차 및 전이된 종양의 퇴행과 함께 강력한 전신 적응성 항종양 면역 및 CD8⁺ T 세포 침윤으로 해석된다.
- [0005] 종양 내(i.t.) 종양용해성 바이러스 요법(oncolytic virotherapy)은 T 세포 침윤을 유도하고 항 PD-1 면역 요법을 향상시킨다(문헌[Ribas et al., 2017]). 항-CTLA-4 및 항-PD-1 항체와의 병용 요법은 단일 작용제 ICB에 비해 효능을 향상시키며, 아마도 이는 전신 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 분화의 보완적 메커니즘과 T 이펙터 및 조절 T 세포의 종양 국소 조절을 통해 가능할 것이다(문헌[Arce Vargas et al., 2018; Wei et al., 2019]). 그러나, 승인된 이필리무맙(ipilimumab)을 포함하여, 전신적으로 투여된 항-CTLA-4의 내약성 문제로 임상 사용이 제한되었다(문헌[Postow et al., 2015]).
- [0006] 전신 항-CTLA-4 항체 요법의 효능 및 내약성은 연결되어 있는 것으로 보인다. 이필리무맙 용량을 증가시키면 효능과 부작용이 모두 향상되었다(문헌[Bertrand et al., 2015]). CTLA-4의 중추 면역 체크포인트 기능과 일치하게, 부작용이 심할 수 있으며 전신 자가면역의 특성일 수 있다(문헌[Tivol et al., 1995]).
- [0007] 흥미롭게도, CD8⁺ 및 CD4⁺ 이펙터 T 세포에 비해 CTLA-4를 과발현하는 종양 내(“i.t.”) Treg 세포의 고갈은 최근 이필리무맙 치료 활성에 기여하는 것으로 보고되었으며, Treg 고갈 강화 항-CTLA-4 항체 변이체는 종양을 보유한 FcγR-인간화 마우스에서 향상된 치료 활성을 보였다(문헌[Arce Vargas et al., 2018]). 이러한 발견은 Treg가 항-CTLA-4 항체를 고갈시키는 종양 국소 요법이 현재 이용 가능한 항-CTLA-4 요법에 비해 부작용이 감소된 강력한 치료 활성을 제공할 수 있음을 나타낸다(문헌[Marabelle et al., 2013a; Marabelle et al., 2013b])—특히 PD-1/PD-L1 축의 차단제 또는 종양용해성 바이러스와 같이 검증되고 안전한 면역 조절제와 결합될 때 더욱 그러하다.
- [0008] 이러한 배경 하에, 본원에서 본 발명자들은 전장(full-length) 인간 재조합 항-CTLA-4 항체를 포함하는 종양용해성 벡터 기반 백시니아 바이러스(VV)를 기술하고 특성화한다. 본 발명자들은 또한 최근에 발견된 전장 인간 재조합 항-CTLA-4 항체를 인코딩하는 종양용해성 바이러스를 기술한다. 이러한 바이러스로 인코딩된 신규 인간 IgG1 CTLA-4 항체(“4-E03”으로 명명)는 단일클론항체(“mAb”) 및 우수한 Treg 고갈 활성과 관련된 표적에 대한 기능 우선 스크리닝을 사용하여 확인되었다. 인간 종양 내 관련 CTLA-4 발현을 특징으로 하는 인간화 마우스 모델에서 4-E03 IgG1은 임상적으로 검증된 이필리무맙과 비교하여 향상된 Treg 고갈을 보여주었다. 대조적으로, 4-E03은이필리무맙과 비교하여 CTLA-4:B7 상호작용을 차단하고 이펙터 T 세포 증식의

CTLA-4 매개 억제를 극복하는 데 유사한 효능을 보인다. 본 발명에서, 종양 선택적 종양용해성 백신니아 벡터가 이 신규한, 강력한 Treg-고갈, 체크포인트 차단, 항-CTLA-4 항체 4-E03 및 GM-CSF(VV_{GM}-ahCTLA4, BT-001)를 인코딩하도록 조작되었다. 매칭되는 Treg-고갈 마우스 대리 항체를 인코딩하는 바이러스가 추가로 생성되어 ICB에 민감하거나 내성이 있는 염증 또는 면역 배제 종양 미세환경을 나타내는 충분 마우스 종양 모델에서 동종 면역(syngeneic immune) 개념 증명 연구가 가능해졌다.

[0009] 이는 항-CTLA-4 항체를 발현하는 종양용해성 바이러스가 항-PD-1/PD-L1 항체와 협력 작용하여 "차가운" 종양(본원에서 "차가운 면역 종양"이라고도 함)을 거부한다는 예상치 못한 발견으로 이어졌다. 이는 본원에 개시된 "차가운 종양" 마우스 모델의 동물과 마찬가지로, 차가운 종양이 전신, 정맥, 단일 제제 또는 현재 이용 가능한 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1과 결합된 ICB에 내성이 있는 것으로 알려져 있기 때문에 놀라운 일이었다.

[0010] 실시예 및 본원에서 논의된 바와 같이, "차가운" 종양은 T 세포 침윤이 불량하다. 놀랍게도, 본 발명자들은 항-CTLA-4 항체 및 항-PD-1/PD-L1 항체를 발현하는 종양 용해성 바이러스와의 조합된 치료가 T 세포의 "차가운" 종양으로의 강한 유입을 유도하였고, 이는 유사하게 "뜨거운" 종양처럼 풍부한 T 세포가 조밀하게 되었다.

[0011] 본 발명자들의 놀라운 발견은 "차가운" 종양을 포함하거나 이로 구성되는 암을 치료하기 위한 유익한 치료적 접근법을 추가로 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 일반적으로 (i) CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; (ii) PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 포함하는 조합에 관한 것으로, 여기서 조합은 환자의 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는 암의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0012] 제1 양태에서, 본 발명은

[0013] - CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및

[0014] - PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자;

[0015] 를 포함하는 환자에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 조합을 제공하며, 여기서 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성된다.

[0016] 제2 양태에서, 본 발명은

[0017] - CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및

[0018] - PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자;

[0019] 의 용도를 환자의 암 치료용 약제의 제조에 제공하며, 여기서 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성된다.

[0020] 제3 양태에서, 본 발명은 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되며, 방법은 환자에게 투여하는 단계를 포함한다:

[0021] - CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스;

[0022] - PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자.

[0023] 제4 양태에서, 본 발명은 PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자와 조합하여 사용하기 위해 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스를 제공하며; 이는 환자의 암을 치료하기 위한 것으로서, 여기서 암은 차가운 종양을 포함하거나 이로 구성된다.

[0024] 상기 논의 및 첨부된 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 상기 양태에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자 및 PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스로 치료하는 것은 환자의 암의 차가운 종양 내로 T 세포의 유입을 유발한다. 이는 환자의 암의 차가운 종양에서 T 세포의 수 및/또는 밀도의 증가를 초래하여, 종양이 유사하게 뜨거운 종양처럼 풍부한 T 세포가 조밀하게 된다. 본 발명의 일 구현예에서, 환자의 암의 차가운 종양 내 T 세포의 수 및/또는 밀도는 대략 5배 내지 25배 이상, 예를 들어, 약 5배, 또는 6배, 또는 7배, 또는 8배, 또는 9배, 또는 10배, 또는 11배, 또는 12배, 또는 13배, 또는 14배, 또는 15배, 또는 16배, 또는 17배, 또는 18배, 또는 19배, 또는 20배, 또는 21배, 또는 22배, 또는 23배, 또는 24배, 또는 25배, 또는 그 이상 증가한다.

- [0025] 따라서, 추가의 양태에서, 본 발명은
- [0026] - CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스; 및
- [0027] - PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자;
- [0028] 를 포함하는 환자의 암에서 차가운 종양 내 T 세포의 수 및/또는 밀도를 증가시키기 위한 용도 및/또는 환자의 암에서 차가운 종양 내로 T 세포의 유입을 매개하기 위한 조합을 제공한다. 그렇게 함으로써, 본 발명이 환자의 암을 치료한다는 것을 알 수 있을 것이다. 본 발명의 일 구현예에서, 환자의 암의 차가운 종양 내 T 세포의 수 및/또는 밀도는 대략 5배 내지 25배 이상, 예를 들어, 약 5배, 또는 6배, 또는 7배, 또는 8배, 또는 9배, 또는 10배, 또는 11배, 또는 12배, 또는 13배, 또는 14배, 또는 15배, 또는 16배, 또는 17배, 또는 18배, 또는 19배, 또는 20배, 또는 21배, 또는 22배, 또는 23배, 또는 24배, 또는 25배, 또는 그 이상 증가한다.
- [0029] 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명의 종양용해성 바이러스는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있다. CD152라고도 공지된 세포독성 T 림프구-연관 항원(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen: CTLA-4 또는 CTLA4)은 T 세포 활성화를 차단하는 B7/CD28 패밀리의 구성원이다. CTLA-4는 활성화된 T 세포에서 발현되고, T 세포에 저해 신호를 전달한다. 이것은 T 세포 공-자극 단백질 CD28과 상동성이며, CTLA-4와 CD28 둘 다는 CD80(B7-1이라고도 언급됨) 및 CD86(B7-2라고도 언급됨)에 결합한다. CTLA4는 또한 조절 T 세포(Treg)에서 발견되며, 저해 기능에 기여한다. CTLA-4 단백질은 세포외 V 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 포함한다.
- [0030] CTLA-4에 결합하는 항체는 면역 이펙터 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포와 면역 억제 T 조절(Treg) 세포 모두에 작용하는 이중 메커니즘에 의해 치료 활성을 발휘하는 것으로 제안되었다. 이펙터 T 세포에서 CTLA-4와 이의 리간드 B7.1 및 B7.2의 상호작용을 차단하는 CTLA-4에 대한 항체는 면역 반응을 향상시킬 수 있으며 강력한 항-종양 면역을 자극할 수 있는 것으로 나타났다(문헌[Korman et al 2006, Checkpoint blockade in cancer immunotherapy, *Adv Immunol.* 90:297-339]).
- [0031] 보다 최근에, Fc 이펙터 기능 및 Treg 고갈은 임상적으로 관련된 항체 이필리무맙 및 트레멜리무맙(tremelimumab)을 포함한 항-CTLA-4 항체의 치료 활성에 기여하고 상관관계가 있는 것으로 나타났다(문헌[Arce Vargas, Furness et al. 2018]). 후자는 중증 및 자가면역 특성일 수 있는 효능 및 독성은 현재 이용 가능한 전신 항-CTLA-4 요법과 관련이 있는 것으로 생각된다. 매우 효과적이면서도 안전한 항-CTLA-4 기반 ICB를 전달하기 위한 접근법이 부족하였다. 본 발명자들은 최근 Treg-고갈 항-CTLA-4 항체(i.t. 벡터화된 항-CTLA-4)를 인코딩하는 종양 내 전달 종양용해성 바이러스가 광범위한 항종양 활성을 갖는다는 것을 입증하였다. 본원에서, 본 발명자들은 예기치 않게, i.t. 벡터화된 항-CTLA-4가 PD-1/PD-L1 ICB의 맥락에서, 전신 항체-매개 ICB에 내성을 갖는 면역 침투성이 낮은 “차가운” 종양에 대한 효능을 갖는다는 것을 입증한다. 또한, 이 접근법과 관련된 종양-제한 항-CTLA-4 노출로 인해, i.t. 벡터화된 항-CTLA-4는 승인된 항-CTLA-4 요법과 비교하여 안전하고 내약성이 우수한 것으로 제시되었다.
- [0032] 본원에서 논의된 바와 같이, 본 발명은 또한 PD-1에 특이적으로 결합하고/하거나 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 항체 분자는 PD-1에 특이적으로 결합하고; 일부 구현예에서, 제2 항체 분자는 PD-L1에 특이적으로 결합하고; 일부 구현예에서, 제2 항체 분자는 PD-1 및 PD-L1 둘 모두에 특이적으로 결합한다.
- [0033] CD279로도 알려진 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1 또는 PD1)은 T 및 B 세포의 표면 상에서 발견되고, T 세포의 활성을 억제한다. PD-1은 2개의 리간드, 즉 PD-L1 및 PD-L2에 결합한다. CD274로도 알려진 프로그래밍된 사멸-리간드 1(PD-L1)은 이의 수용체 PD-1에 결합하여 T 세포의 증식을 감소시키는 억제 신호를 생성한다.
- [0034] 항체는 면역학 및 분자 생물학 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 전형적으로, 항체는 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 본원에서, 본 발명자들은 때때로 이 완전한 항체 분자를 전체-크기(full-size) 또는 전장 항체라고 지칭한다. 항체의 중쇄는 1개의 가변 도메인(VH) 및 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)를 포함하고, 항체의 분자 경쇄는 1개의 가변 도메인(VL) 및 1개의 불변 도메인(CL)을 포함한다. 가변 도메인(때때로 집합적으로 F_V 영역으로서 지칭됨)은 항체의 표적, 또는 항원에 결합한다. 각 가변 도메인은 표적 결합을 담당하는 상보적 결정 영역(CDR)으로서 지칭되는 3개의 루프를 포함한다. 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접적으로 관여하지 않으나, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체 또는 면역글로불린은 이들의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라 상이한 부류로 할당될 수 있다. 면역글로불린의 5가지의 주요 부류:

IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM가 존재하고, 인간에서 이들 중 몇 가지는 하위부류(아이소타입): 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4; IgA1 및 IgA2로 추가로 나뉜다. 항체의 또 다른 부분은 Fc 도메인(달리, 단편 결정화 도메인으로서 공지됨)으로, 이는 항체의 각 중쇄의 2개의 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 항체와 Fc 수용체 사이의 상호작용을 담당한다.

[0035] Fc 수용체는 면역계의 세포의 세포 표면 상에서 종종 발견되는 막 단백질이다(즉, Fc 수용체는 표적 세포 막에서 발견되고 - 달리는 원형질막 또는 세포질막이라고 공지됨). Fc 수용체의 역할은 Fc 도메인을 통해서 항체에 결합하고, 항체를 세포에 내재화시키는 것이다. 면역계에서, 이것은 항체-매개 식세포작용 및 항체-의존적 세포-매개 세포독성을 초래할 수 있다.

[0036] Fc 수용체의 하위그룹은 Fc γ 수용체(Fc-감마 수용체, Fc감마R)로, 이는 IgG 항체에 특이적이다. 두 유형의 Fc γ 수용체가 존재한다: 활성화 Fc γ 수용체(또한 활성적 Fc γ 수용체로도 지칭) 및 저해성 Fc γ 수용체. 활성화 및 저해성 수용체는 각각 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM) 또는 면역수용체 티로신-기반 저해성 모티프(ITIM)를 통해 이들의 신호를 전달한다. 인간에서, Fc γ RIIb(CD32b)는 저해성 Fc γ 수용체인 반면, Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32a), Fc γ RIIc(CD32c), Fc γ RIIIa(CD16a) 및 Fc γ RIV는 활성화 Fc γ 수용체이다. Fc γ RIIIb는 ITAM 모티프가 결여되어 있는 호중구 상 발현된 GPI-결합 수용체이지만, 지질 래프트를 가교하고 다른 수용체와 연계하는 능력을 통해 또한 활성적인 것으로 간주된다. 마우스에서, 활성화 수용체는 Fc γ RI, Fc γ RIII 및 Fc γ RIV이다.

[0037] 항체가 Fc γ 수용체와의 상호작용을 통해 면역 세포 활성을 조정하는 것은 익히 공지되어 있다. 구체적으로, 항체 면역 복합체가 면역 세포 활성화를 조정하는 방법은 활성화 및 저해성 Fc γ 수용체의 이들의 상대적 연계에 의해 결정된다. 상이한 항체 아이소타입은 Fc γ 수용체를 활성화 및 억제하는 데 서로 다른 친화력으로 결합하여 서로 다른 A:I 비율을 초래한다(활성:억제 비)(문헌[Nimmerjahn et al; Science. 2005 Dec 2;310(5753):1510-2]).

[0038] 저해성 Fc γ 수용체에 결합함으로써, 항체는 이펙터 세포 기능을 억제, 차단 및/또는 하향조정할 수 있다.

[0039] 활성적 Fc γ 수용체에 결합함으로써, 항체는 이펙터 세포 기능을 활성화시킬 수 있고, 이로써 항체-의존적 세포 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 포식작용(ADCP), 사이토카인 방출, 및/또는 항체 의존적 세포내이입뿐 아니라, 호중구의 경우 NETosis(즉, NET, 호중구 세포외 트랩(Neutrophil extracellular trap)의 활성화 및 방출)와 같은 기전을 유발할 수 있다. 활성화 Fc γ 수용체에 결합하는 항체는 또한 CD40, MHCII, CD38, CD80 및/또는 CD86과 같은 특정 활성화 마커의 증가로 이어질 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 Fc γ 수용체 결합 항체이다. "Fc γ 수용체 결합 항체"는 항체 분자가 Fc 영역을 통해 적어도 하나의 Fc γ 수용체에 결합할 수 있음을 의미한다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 항체 분자는 전장 또는 전체-크기 항체뿐 아니라 전장 항체의 작용적 단편 및 이러한 항체 분자의 유도체를 포함한다.

[0042] 전체-크기 항체의 기능성 단편은 상응하는 전체-크기 항체와 동일한 항원 결합 특징을 갖고, 동일한 가변 도메인(즉, VH 및 VL 서열) 및/또는 상응하는 전체-크기 항체와 동일한 CDR 서열을 포함한다. 기능성 단편은 상응하는 전체-크기 항체와 동일한 항원 결합 특징을 갖는다는 것은 이것이 전체-크기 항체와 동일한 표적 상의 에피토프에 결합한다는 것을 의미한다. 이러한 기능성 단편은 전체-크기 항체의 Fv 부분에 상응할 수 있다. 대안적으로, 이러한 단편은 Fc 부분을 함유하지 않는 1가 항원-결합 단편인, Fab'로도 나타내는 Fab, 또는 디설파이드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 항원-결합 Fab 부분을 함유하는 2가 항원-결합 단편인 (Fab')₂, 또는 (Fab')₂의 1가-변이체인 Fab'일 수 있다. 이러한 단편은 또한 단쇄 가변 단편(scFv)일 수도 있다.

[0043] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 제1 항체 분자 및/또는 제2 항체 분자는 전체-크기 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 및 이의 항원-결합 단편(예를 들어, Fab, Fv, scFv, Fab' 및 (Fab')₂)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0044] 기능성 단편이 항상 상응하는 전체-크기 항체 중 모든 6개의 CDR을 함유하는 것은 아니다. 3개 이하의 CDR 영역(일부 경우에, 심지어 단일 CDR 또는 이의 일부)을 함유하는 분자는 CDR(들)이 유래된 항체의 항원-결합 활성을 보유할 수 있는 것으로 인지된다. 예를 들어, 문헌[Gao et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 32389-93]에서는, 전체 VL 사슬(3개의 모든 CDR)이 그의 기질에 대한 높은 친화성을 갖는 것으로 기재되어 있다.

[0045] 2개의 CDR 영역을 함유하는 분자가 예를 들어 문헌[Vaughan & Sollazzo 2001, *Combinatorial Chemistry*

& High Throughput Screening, 4: 417-430]에 기재되어 있다. 418 페이지(오른쪽 열 - 3 우리의 설계 전략)에서, 프레임워크 영역 내 산재된 H1 및 H2 CDR 고가변 영역만을 포함하는 미니바디(minibody)가 기재되어 있다. 미니바디는 표적에 결합할 수 있는 것으로서 기재되어 있다. 문헌[Pessi et al., 1993, *Nature*, 362: 367-9 및 Bianchi et al., 1994, *J. Mol. Biol.*, 236: 649-59]는 Vaughan & Sollazzo가 참조하며, 이것은 H1 및 H2 미니바디 및 이의 특성을 보다 상세하게 설명한다. 문헌[Qiu et al., 2007, *Nature Biotechnology*, 25:921-9]에서, 2개의 연결된 CDR로 이루어진 분자가 항원을 결합할 수 있음이 입증되었다. 문헌[Quiocho 1993, *Nature*, 362: 293-4]은 "미니바디" 기술의 요약을 제공한다. 문헌[Ladner 2007, *Nature Biotechnology*, 25:875-7]은 2개의 CDR을 함유하는 분자가 항원-결합 활성을 보유할 수 있다는 점을 언급했다.

[0046] 단일 CDR 영역을 함유하는 항체 분자는 예를 들어, 문헌[Laune et al., 1997, *JBC*, 272: 30937-44]에 기재되어 있는데, 여기서 CDR로부터 유래된 다양한 헥사펩티드가 항원-결합 활성을 보이는 것이 입증되었고, 완전한, 단일 CDR의 합성 펩티드는 강한 결합 활성을 나타내는 것이 주목된다. 문헌[Monnet et al., 1999, *JBC*, 274: 3789-96]에서, 다양한 12-머 펩티드 및 연관된 프레임워크 영역이 항원-결합 활성을 갖는 것을 나타내며, CDR3-유사 펩티드 단독이 항원을 결합할 수 있다고 언급되어 있다. 문헌[Heap et al., 2005, *J. Gen. Virol.*, 86: 1791-1800]에서는, "마이크로-항체"(단일의 CDR을 함유하는 분자)가 항원을 결합할 수 있다고 보고되어 있고, 항-HIV 항체로부터의 사이클릭 펩티드가 항원-결합 활성 및 기능을 갖는 것으로 나타내어져 있다. 문헌[Nicaise et al., 2004, *Protein Science*, 13:1882-91]에서는, 단일의 CDR이 항원-결합 활성 및 이것의 라이소자임 항원에 대한 친화성을 부여할 수 있는 것으로 나타내어져 있다.

[0047] 따라서, 5개, 4개, 3개 또는 그보다 적은 개수의 CDR을 갖는 항체 분자는 이들이 유래된 전장 항체의 항원 결합 특성을 보유할 수 있다.

[0048] 항체 분자는 또한 전장 항체의 유도체 또는 이러한 항체의 단편일 수 있다. 유도체는 상응하는 전체-크기 항체와 동일한 항원 결합 특징을 갖는다는 것은 이것이 전체-크기 항체와 표적 상의 동일한 에피토프에 결합한다는 것을 의미한다.

[0049] 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "항체 분자"에서, 본 발명자들은 모든 유형의 항체 분자 및 이의 기능성 단편 및 이의 유도체, 예컨대, 단일클론 항체, 다클론 항체, 합성 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 다중-특이적 항체, 이중-특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 가변 단편(Fv), 단쇄 가변 단편(scFv 단편), 예컨대, 2가 단쇄 가변 단편(di-scFvs) 및 디설파이드-결합 가변 단편, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄의 동중-이량체, 항체 경쇄의 동중-이량체, 항체 중쇄의 이중이량체, 항체 경쇄의 이중이량체, 이러한 동중- 및 이중이량체를 포함한다.

[0050] 나아가, 본원에서 이용되는 바와 같이 용어 "항체 분자"는 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD, 및 IgE를 포함하는, 모든 부류의 항체 분자 및 기능성 단편을 포함한다.

[0051] 일부 구현예에서, 항체는 인간 IgG1이다. 당업자는 마우스 IgG2a 및 인간 IgG1이 활성적 Fc 감마 수용체와 생산 가능하게 연계되고, 예를 들어 ADCP 및 ADCC에 의해 활성적 Fc 감마 수용체 보유 면역 세포(예를 들어, 대식 세포 NK 세포)의 활성화를 통해 표적 세포의 결실을 활성화시키는 능력을 공유한다는 것을 인식한다. 이와 같이, 마우스 IgG2a는 마우스에서 결실에 바람직한 아이소타입인 반면, 인간 IgG1은 인간에서 결실에 바람직한 아이소타입이다. 이에 반해서, TNFR 슈퍼패밀리 효능제 수용체, 예를 들어, 4-1BB, OX40, TNFR11, CD40의 최적의 공-자극은 저해성 Fc γ RIIB의 항체 결속에 좌우된다고 공지되어 있다. 마우스에서, 저해성 Fc 감마 수용체(Fc γ RIIB)에 우세하게 결합하고, 활성 Fc 감마 수용체에는 단지 약하게 결합하는 IgG1 아이소타입은 TNFR-슈퍼패밀리 표적화 mAb의 공자극 활성화에 최적인 것으로 공지되어 있다. 인간에서 마우스 IgG1 아이소타입의 직접적인 등가물이 기재되지 않았지만, 항체는 활성 인간 Fc 감마 수용체에 비해 저해에 대해 유사하게 강화된 결합을 나타내도록 조작될 수 있다. 이러한 조작된 TNFR-슈퍼패밀리 표적화 항체는 또한 인간 활성 및 저해 Fc 감마 수용체를 발현하도록 조작된 트랜스제닉 마우스에서 향상된 생체내 공-자극 활성을 갖는다(문헌[Dahan et al., 2016, Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fc γ R Engagement. *Cancer Cell*. 29(6):820-31]).

[0052] 상기 개략된 바와 같이, 항체 분자의 상이한 유형 및 형태가 본 발명에 포함되며, 면역학 분야의 당업자에게 공지될 것이다. 치료 목적으로 사용되는 항체는 종종 항체 분자의 특성을 변형시키는 추가적인 성분으로 변형된다는 것이 널리 공지되어 있다.

[0053] 그러므로, 본 발명자들은 본 발명의 항체 분자 또는 본 발명에 따라 사용된 항체 분자(예를 들어, 단일클론 항

체 분자 및/또는 다클론 항체 분자 및/또는 이중특이적 항체 분자)가 검출 가능한 모이어티(moiety) 및/또는 세포독성 모이어티를 포함한다는 것을 포함한다.

- [0054] “검출가능한 모이어티”는 효소; 방사성 원자; 형광 모이어티; 화학 발광 모이어티; 생물 발광 모이어티를 포함하는 군으로부터 하나 이상을 포함한다. 검출 가능한 모이어티는 항체 분자가 시험관내 및/또는 생체내 및/또는 생체외에서 시각화될 수 있게 한다.
- [0055] “세포독성 모이어티”는 방사성 모이어티, 및/또는 효소(예를 들어, 여기서 효소는 카스파제) 및/또는 독소(예를 들어, 여기서 독소는 박테리아 독소 또는 독물)를 포함하며; 여기서 세포독성 모이어티는 세포 용해를 유도할 수 있다.
- [0056] 본 발명자들은 항체 분자가 단리된 형태 및/또는 정제된 형태일 수 있고/있거나 PEG화될 수 있음을 추가로 포함한다.
- [0057] 상기 논의된 바와 같이, 항체의 CDR은 항체 표적에 결합한다. 본원에서 기재된 각 CDR에 아미노산을 할당하는 것은 문헌[Kabat EA et al. 1991, In “Sequences of Proteins of Immunological Interest” Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242, pp xv- xvii]에 따른 정의에 따른다.
- [0058] 당업자가 인식하고 있는 바와 같이, 아미노산을 각 CDR에 할당하기 위한 다른 방법이 또한 존재한다. 예를 들어, 국제 ImMunoGeneTics 정보 시스템(IMG(T))(<http://www.imgt.org/> 및 Lefranc 및 Lefranc “The Immunoglobulin FactsBook” Academic Press에 의해 공개됨, 2001).
- [0059] 추가 구현예에서, 본 발명의 또는 본 발명에 따라 사용되는 CTLA-4 특이적 항체분자는 본원에 기재된 특이적 항체, 예컨대, 서열번호 15, 16, 17, 10, 18 및 19 또는 서열번호 22, 23, 24, 10, 25 및 26을 포함하는 항체 분자와 경쟁할 수 있는 항체 분자이다.
- [0060] “경쟁할 수 있는”이란, 경쟁 항체가 본원에서 정의된 바와 같은 항체 분자의 특정 표적에의 결합을 적어도 부분적으로 저해하거나 그렇지 않으면 방해할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0061] 예를 들어, 이러한 경쟁 항체 분자는 본원에 기재된 항체 분자의 결합을 적어도 약 10%; 예를 들어, 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100% 억제할 수 있고/있거나 특정 표적에 대한 결합을 방지 또는 감소시키기 위한 본원에 기재된 항체의 능력을 적어도 약 10%; 예를 들어, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100% 억제할 수 있다.
- [0062] 경쟁 결합은 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)과 같은 당업자에게 익히 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0063] ELISA 검정은 에피토프-변형 또는 차단 항체를 평가하는데 사용될 수 있다. 경쟁 항체를 동정하기에 적합한 추가적인 방법은 본원에서 참조로 포함되는 문헌[*Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane(예를 들어, 페이지 567 내지 569, 574 내지 576, 583 및 590 내지 612, 1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2 참조)에 개시되어 있다.
- [0064] 항체는 정의된 표적 분자 또는 항원에 특이적으로 결합한다는 것이 널리 공지되어 있고, 즉, 이것은 항체가 우세하게 그리고 선택적으로 표적이 아닌 분자가 아니라 이의 표적과 결합한다는 것을 의미한다.
- [0065] 본 발명에 따른 제1 및 제2 항체(CTLA-4, PD1, PD-L1) 또는 본 발명에 따라서 사용되는 제1 및 제2 항체의 표적은 세포의 표면에서 발현되고, 즉, 이것은 세포 표면 항원이며, 항체에 대한 에피토프(달리는 이러한 맥락에서 세포 표면 에피토프로서 알려짐)를 포함할 것이다. 세포 표면 항원 및 에피토프는 면역학 또는 세포 생물학의 당업자에 의해 용이하게 이해될 수 있는 용어이다.
- [0066] “세포 표면 항원”은 본원에 기재된 항체 분자가 세포막의 세포외 측면 상에 노출되는 세포 표면 항원 또는 적어도 에피토프를 포함한다.
- [0067] 단백질 결합 평가 방법은 생화학 또는 면역학의 당업자에게 공지되어 있다. 당업자는 이 방법이 항체의 표적과의 결합 및/또는 항체의 Fc 도메인의 Fc 수용체와의 결합뿐 아니라; 이들 상호작용의 상대적 강도, 또는 특이성, 또는 저해, 또는 방지 또는 감소를 평가하는데 사용될 수 있다는 점을 인지할 것이다. 단백질 결합을 평가하는데 사용될 수 있는 방법의 예는 예를 들어 면역검정, BIAcore, 웨스턴 블롯, 방사면역검정(RIA: radioimmunoassay) 및 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)이다(항체 특이성

에 대한 논의를 위해, 문헌[Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336 (1989)]을 참조).

- [0068] 따라서, 본원에서, "CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자" 및 "항-CTLA-4 항체 분자"는 표적 CTLA-4에 특이적으로 결합하지만 비-표적에는 결합하지 않거나, 표적보다 비-표적에 보다 약하게(예컨대, 더 낮은 친화성으로) 결합하는 항체 분자를 지칭한다.
- [0069] 비슷하게, 본원에서, "PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 분자" 및 "항-PD-1 항체 분자"는 표적 PD-1에 특이적으로 결합하지만 비-표적에는 결합하지 않거나, 표적보다 비-표적에 보다 약하게(예컨대, 더 낮은 친화성으로) 결합하는 항체 분자를 지칭한다.
- [0070] 본원에서, "PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자" 및 "항-PD-L1 항체 분자"는 표적 PD-L1에 특이적으로 결합하지만 비-표적에는 결합하지 않거나, 표적보다 비-표적에 보다 약하게(예컨대, 더 낮은 친화성으로) 결합하는 항체 분자를 지칭한다.
- [0071] 일부 구현예에서, CTLA-4(또는 항-CTLA-4 항체 분자)에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 CTLA-4의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, PD-1(또는 항-PD-1 항체 분자)에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 PD-1의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, PD-L1(또는 항-PD-L1 항체 분자)에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 PD-L1의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 지칭한다.
- [0072] 또한 본 발명자들은 항체가 표적 CTLA-4 또는 PD-1 또는 PD-L1에 비-표적보다 적어도 2배 더 강하게, 적어도 5배 더 강하게, 또는 적어도 10배 더 강하게, 또는 적어도 20배 더 강하게, 또는 적어도 50배 더 강하게, 또는 적어도 100배 더 강하게, 또는 적어도 200배 더 강하게, 또는 적어도 500배 더 강하게, 또는 적어도 약 1000배 더 강하게 특이적으로 결합한다는 의미를 포함한다.
- [0073] 추가로, 본 발명자들은 항체가 표적 CTLA-4 또는 PD-1 또는 PD-L1에 적어도 약 10^{-1} M, 또는 적어도 약 10^{-2} M, 또는 적어도 약 10^{-3} M, 또는 적어도 약 10^{-4} M, 또는 적어도 약 10^{-5} M, 또는 적어도 약 10^{-6} M, 또는 적어도 약 10^{-7} M, 또는 적어도 약 10^{-8} M, 또는 적어도 약 10^{-9} M, 또는 적어도 약 10^{-10} M, 또는 적어도 약 10^{-11} M, 또는 적어도 약 10^{-12} M, 또는 적어도 약 10^{-13} M, 또는 적어도 약 10^{-14} M, 또는 적어도 약 10^{-15} M의 해리 상수(K_D)로 표적에 결합하는 경우 이것이 표적에 특이적으로 결합한다는 의미를 포함한다.
- [0074] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 종양용해성 바이러스는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체를 발현한다.
- [0075] 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 Fc γ 수용체 결합 항체이다.
- [0076] 일부 구현예에서, 제1 항체 분자는 이필리무맙 및 트레멜리무맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0077] 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자(또는 항-CTLA-4 항체 분자)는 CD28과 교차 반응하지 않는다. 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자(또는 항-CTLA-4 항체 분자)는 CD80 및/또는 CD86에 대한 CTLA-4의 결합을 차단함으로써, CTLA-4 신호전달을 저해한다.
- [0078] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자(또는 항-CTLA-4 항체 분자)는 이필리무맙에 비해서 CTLA-4 양성 세포에 대해서 향상된 고갈 효과를 갖는다.
- [0079] 항체 분자가 CTLA-4 양성 세포에 대해서 고갈 효과를 갖는다는 것은, 대상체, 예컨대, 인간에게 투여될 때, 이러한 항체가 CTLA-4 양성 세포의 표면 상에서 발현되는 CTLA-4에 특이적으로 결합하고, 이러한 결합이 이러한 세포의 고갈을 초래한다는 것을 의미한다.
- [0080] 일부 구현예에서, CTLA-4 양성 세포는 CD4 양성($CD4^+$) 세포, 즉, CD4를 발현하는 세포이다.
- [0081] 일부 구현예에서, CTLA-4 양성 세포는 CD4 양성 및 FOXP3 양성 둘 다이고, 즉, CD4 및 FOXP3 둘 다를 발현한다. 이러한 세포는 Treg이다. CD8 양성 T 세포는 또한 CTLA-4를 발현하지만, Treg는 CD8 양성 T 세포보다 CTLA-4를 상당히 더 높은 수준으로 발현한다. 이것은 더 낮은 발현 $CD8^+$ 세포에 비해 Treg가 고갈에 더 취약하게 만든다.
- [0082] 일부 상황에서, CTLA-4는 종양 미세환경(종양 침윤 세포, TILS)에서 면역 세포 상에서 우선적으로 발현된다.

- [0083] 따라서, 종양 미세환경에서, Treg는 CTLA-4의 최대 발현을 갖는 세포여서, Treg 고갈 효과를 갖는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자(또는 항-CTLA-4 항체 분자)를 야기할 것이다.
- [0084] 따라서, 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 Treg 고갈 항체이다.
- [0085] 상기에 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 항-CTLA-4 항체 분자는 Treg 고갈 항체 분자일 수 있고, 이것은 대상 체, 예컨대, 인간에게 투여될 때, 이러한 항체 분자가 Treg의 표면 상에서 발현되는 CTLA-4에 특이적으로 결합하고, 이러한 결합이 Treg의 고갈을 초래한다는 것을 의미한다.
- [0086] 본원에서 언급된 바와 같이 항체 분자가 Treg 고갈 효과를 갖는 항체 분자인지 여부를 결정하기 위해(예를 들어, 이것은 이필리무맵에 비해 향상된 고갈 효과일 수 있음), PBMC-NOG/SCID 모델에서 시험관 내 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 검정 또는 생체 내 시험을 사용하는 것이 가능하다.
- [0087] GFP와 함께 CD16-158V 대립유전자를 발현하도록 안정적으로 형질주입된 NK-92 세포주를 사용하여 수행되는 시험 관내 ADCC 시험, 여기서 ADCC 시험은 하기 연속적인 7개의 단계를 포함한다:
- [0088] 1) CTLA-4 양성 세포, 표적 세포로서의 CD4 양성 세포 또는 Treg를 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 단리한다. 이러한 단리는 $CD4^+$ T 세포 단리 키트, 예컨대, Miltenyi Biotec로부터의 상업용 키트를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0089] 2) 이어서 표적 세포를 예를 들어, 48시간 동안, CD3/CD28로, 예를 들어 CD3/CD28 Dynabeads® 및 rhIL-2, 예컨대, 50ng/ml의 rhIL-2를 사용하여 자극한다. 자극은 37°C에서 수행될 수 있다.
- [0090] 3) 이어서 표적 세포를 시험될 항체 분자와 함께, 예를 들어, 10 μ g/ml로 30분 동안 4°C에서 사전 인큐베이션하고, 이어서 NK 세포와 혼합한다.
- [0091] 4) 이어서 표적 세포를 HEPES 완충액, 피루브산 나트륨 및 FBS 저 IgG를 함유하는 RPMI 1640 + GlutaMAX 배지에서 적절한 시간, 예컨대, 4시간 동안 인큐베이션한다. RPMI 1640 + GlutaMAX 배지는 10mM의 HEPES 완충액, 1mM의 피루브산 나트륨 및 10%의 FBS 저 IgG를 함유할 수 있고, 이펙터:표적 세포 비는 2:1일 수 있다.
- [0092] 5) 유세포 분석법에 의해서 용해를 결정한다.
- [0093] 6) 단계 3에서 시험된 항체 분자 대신에 이필리무맵을 사용하여 단계 1 내지 5를 반복하거나 또는 동시에 수행한다.
- [0094] 7) 시험된 항체 분자에 대한 용해 결과를 이필리무맵에 대한 용해의 결과와 비교한다. 이필리무맵에 비해서 시험된 항체 분자에 대한 향상된 용해는, 시험된 항체 분자가 어느 표적 세포가 사용됐는지에 따라서 각각 CTLA-4 양성 세포, CD4 양성 세포 또는 Treg에 대해서 향상된 고갈 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0095] 일부 구현예에서, 상기 단계 7)에서의 향상된 고갈 효과는 상당히 향상된 고갈 효과이다.
- [0096] 생체내 시험은 PBMC 마우스와 NOG/SCID 마우스를 함께 사용하는 것을 기초로 하는데, 이것을 본원에서 PBMC-NOG/SCID 모델이라고 부른다. PBMC 마우스 및 NOG/SCID 마우스 둘 다는 널리 공지된 모델이다. PBMC-NOG/SCID 모델에서의 생체내 시험은 하기 연속적인 9개의 단계를 포함한다:
- [0097] 1) 인간 PBMC(말초 혈액 단핵 세포)를 단리하고, 세척하고, 멸균 PBS 중에 재현탁한다. 일부 구현예에서, PBMC를 75×10^6 개 세포/ml로 PBS 중에 재현탁한다.
- [0098] 2) NOG 마우스에게 적절한 양, 예컨대, 200 μ l의 단계 1)로부터의 세포 현탁액을 i.v.(정맥내)로 주사한다. 200 μ l을 주사하는 경우, 이것은 15×10^6 개 세포/마우스에 상응한다.
- [0099] 3) 적합한 시간, 예컨대, 주사 후 제2주째, NOG 마우스로부터의 비장을 단리하고, 단일 세포 현탁액으로 만든다. 임의로, CTLA-4 발현을 확인하기 위해서, 단일 세포 현탁액으로부터 소량의 샘플을 취하여 FACS에 의해서 인간 T 세포 상에서 CTLA-4의 발현을 결정한다.
- [0100] 4) 단계 3)으로부터의 세포 현탁액을 멸균 PBS 중에 재현탁한다. 일부 구현예에서, 세포 현탁액을 50×10^6 개 세포/ml로 멸균 PBS 중에 재현탁한다. 선택적인 CTLA-4 발현 결정이 단계 3에 포함되는 경우, 세포 현탁액의 나머지를 단계 4에서 재현탁한다.
- [0101] 5) SCID 마우스에게 적절한 양, 예컨대, 200 μ l의 단계 4)로부터의 현탁액을 i.p.(복강내)로 주사한다. 200 μ l

을 주사하는 경우, 이것은 10×10^6 개 세포/마우스에 상응한다.

- [0102] 6) 단계 5)에서의 주사 후, 적절한 시간, 예컨대, 1시간에, SCID 마우스를 적절한 양, 예컨대, 10mg/kg의 시험될 항체 분자, 이필리무맵 또는 아이소타입 대조군 단일클론 항체로 처리한다.
- [0103] 7) 처리된 SCID 마우스의 복강내 유체를 단계 6)에서의 처리 후 적절한 시간, 예컨대, 24시간에 수집한다.
- [0104] 8) 인간 T 세포 하위세트를 식별하고, 하기 마커: CD45, CD4, CD8, CD25 및/또는 CD127을 사용하여 FACS에 의해서 정량한다.
- [0105] 9) 시험된 항체 분자로 처리된 마우스로부터의 T 세포 하위세트의 식별 및 정량으로부터의 결과를 이필리무맵으로 처리된 마우스로부터의 T 세포 하위세트의 식별 및 정량으로부터의 결과 및 아이소타입 대조군 단일클론 항체로 처리된 마우스로부터의 T 세포 하위세트의 식별 및 정량으로부터의 결과와 비교한다. 이필리무맵으로 처리된 마우스로부터의 복강내 유체 중의 CTLA-4 양성 세포의 수와 비교하여 시험될 항체 분자로 처리된 마우스로부터의 복강내 유체 중의 CTLA-4 양성 세포의 더 적은 수는 항체 분자가 이필리무맵에 비해서 CTLA-4 양성 세포에 대해서 향상된 고갈 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. 이필리무맵으로 처리된 마우스로부터의 복강내 유체 중의 CD4 양성 세포의 수와 비교하여 시험될 항체 분자로 처리된 마우스로부터의 복강내 유체 중의 CD4 양성 세포의 더 적은 수는 항체 분자가 이필리무맵에 비해서 CD4 양성 세포에 대해서 향상된 고갈 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. 이필리무맵으로 처리된 마우스로부터의 복강내 유체 중의 Treg 양성 세포의 수와 비교하여 시험될 항체 분자로 처리된 마우스로부터의 복강내 유체 중의 Treg 양성 세포의 더 적은 수는 항체 분자가 이필리무맵에 비해서 Treg 양성 세포에 대해서 향상된 고갈 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0106] 이러한 생체내 시험에서, 일부 구현예에서 단계 7에서 Treg 고갈을 살펴보는 것이 가장 흥미롭다.
- [0107] Treg 고갈은 또한 당업자에게 공지된 바와 같이 항체-의존적 세포 식세포작용(ADCP) 검정에서 측정될 수 있다.
- [0108] 일부 구현예에서, 항체 분자는 Yervoy(이필리무맵)에 비해서 B7.1 및 B7.2 리간드와의 CTLA-4 상호작용에 대해서 유사한 차단 효과를 갖는다. 이것은 ELISA에 의해서 또는 항-CTLA-4 항체가 포도상구균 장독소 B(SEB: Staphylococcus Enterotoxin B)로의 PBMC의 자극에 대한 반응으로 T 세포에 의한 IL-2 생산을 향상시키는 보다 기능성인 검정에 의해서 평가될 수 있다.
- [0109] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 인간 항체 분자이다. 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 인간 화 항체 분자이다. 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 인간 기원의 항체 분자인데, 이는 그것이 인간 항체 분자로부터 유래되고, 이어서 변형되었다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 인간 IgG1 항체이다.
- [0110] 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자는 인간 IgG 항체, 인간화 IgG 항체 및 인간 기원의 IgG 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0111] 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자는 전체-크기 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 및 이의 항원-결합 단편(예를 들어, Fab, Fv, scFv, Fab' 및 (Fab')₂)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0112] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 하나 또는 몇몇의 활성 Fc 수용체에 대해서 향상된 결합을 나타내고/내거나 하나 또는 몇몇 활성 Fc 수용체에 대한 향상된 결합을 위해서 조작된 인간 IgG1 항체의 형태의 항체이고; 따라서, 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 Fc-조작된 인간 IgG1 항체이다.
- [0113] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 무린 또는 인간화 무린 IgG2a 항체이다.
- [0114] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 인간 CTLA-4와 교차 반응성인 무린 항체이다.
- [0115] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 단일클론 항체 또는 단일클론 기원의 항체 분자이다. 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 다클론 항체이다.
- [0116] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 하기 표 1에 제공된 3개의 대안적인 VH-CDR1 서열 중 하나, 3개의 대안적인 VH-CDR2 서열 중 하나, 2개의 대안적인 VH-CDR3 서열 중 하나, 2개의 VL-CDR1 서열 중 하나, 2개의 VL-CDR2 서열 중 하나 및/또는 2개의 대안적인 VL-CDR3 서열 중 하나를 포함하는 항체 분자이다.
- [0117] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 3, 6, 8, 10, 12 및 14로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 중 1 내지 6개를 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0118] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 3, 6, 8, 10, 12 및 14를 갖는 CDR을 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0119] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 CDR, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1 및 VL-CDR3 중 1 내지 6개를 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- [0120] 여기서 VH-CDR1은, 존재하는 경우, 서열번호 15, 22, 29, 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0121] 여기서 VH-CDR2는, 존재하는 경우, 서열번호 16, 23, 30, 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0122] 여기서 VH-CDR3는, 존재하는 경우, 서열번호 17, 24, 31, 및 37로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0123] 여기서 VL-CDR1은, 존재하는 경우, 서열번호 10 및 38로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0124] 여기서 VL-CDR2는, 존재하는 경우, 서열번호 18, 25, 32, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0125] 여기서 VL-CDR3는, 존재하는 경우, 서열번호 19, 26 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0126] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 6개의 CDR을 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 분자이다:
- [0127] 서열번호 15, 16, 17, 10, 18 및 19;
- [0128] 서열번호 22, 23, 24, 10, 25 및 26;
- [0129] 서열번호 29, 30, 31, 10, 32 및 26; 및
- [0130] 서열번호 35, 36, 37, 38, 39 및 40.
- [0131] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 15, 16, 17, 10, 18 및 19를 갖는 6개의 CDR을 포함하는 항체 분자이다.
- [0132] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 22, 23, 24, 10, 25 및 26을 갖는 6개의 CDR을 포함하는 항체 분자이다.
- [0133] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 20, 27, 33, 및 41로 이루어진 군으로부터 선택된 VH를 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 분자이다.
- [0134] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 21, 28, 34 및 42로 이루어진 군으로부터 선택된 VL을 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 분자이다.
- [0135] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 20 내지 21, 27 내지 28, 33 내지 34 및 41 내지 42로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함하는 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 분자이다.
- [0136] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 20을 갖는 VH 및 서열번호 21을 갖는 VL을 포함한다.
- [0137] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 27을 갖는 VH 및 서열번호 28을 갖는 VL을 포함한다.
- [0138] 일부 구현예에서, 제1 항체 분자는 서열번호 20 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄를 포함한다. 일부 추가적인 또는 대안적인 구현예에서, 제1 항체 분자는 서열번호 21 및 28로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄를 포함한다.
- [0139] 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 43을 갖는 중쇄 불변 영역(CH)을 포함한다. 일부 추가적인 또는 대안적인 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 44를 갖는 경쇄 불변 영역(CL)을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 서열번호 43 및 44를 갖는 불변 영역을 포함한다.

[0140] [표 1]

본원에 개시된 항체의 일반적인 CDR 서열

항체의 관련 부분	서열	식별되지 않은 아미노산 잔기의 설명	서열 번호
VH-CDR1 대안 1	FX ₁ X ₂ YX ₃ MX ₄ WX ₅ R QAPG	X ₁ = S 또는 K; X ₂ = D, S 또는 A; X ₃ = Y, S 또는 A; X ₄ = S 또는 N; 및 X ₅ = V 또는 I	1
VH-CDR1 대안 2	FSX ₁ YX ₂ MX ₃ WVRQ APG	X ₁ = D 또는 S; X ₂ = Y, S 또는 A; 및 X ₃ = S 또는 N	2
VH-CDR1 대안 3	FSX ₁ YX ₂ MX ₃ WVRQ APG	X ₁ = D 또는 S; X ₂ = Y 또는 S; 및 X ₃ = S 또는 N	3
VH-CDR2, 대안 1	SX ₁ ISX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ ADSVKGR	X ₁ = G 또는 A; X ₂ = W, G 또는 N; X ₃ = S 또는 T; X ₄ = S 또는 G; X ₅ = R 또는 G; X ₆ = D, S 또는 Y; X ₇ = K, T 또는 I; X ₈ = G, Y, H 또는 D; X ₉ = Y 또는 F	4
VH-CDR2, 대안 2	SX ₁ ISX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ YADSVKGR	X ₁ = G 또는 A; X ₂ = W, G 또는 N; X ₃ = S 또는 T; X ₄ = S 또는 G; X ₅ = R 또는 G; X ₆ = D, S 또는 Y; X ₇ = K, T 또는 I; X ₈ = G, Y, H 또는 D	5
VH-CDR2, 대안 3	SX ₁ ISX ₂ SX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ YADSVKGR	X ₁ = G 또는 A; X ₂ = W 또는 G; X ₃ = S 또는 G; X ₄ = R 또는 G; X ₅ = D 또는 S; X ₆ = K 또는 T; X ₇ = G 또는 Y, H 또는 D	6
VH-CDR3 대안 1	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅	X ₁ = T 또는 A; X ₂ = T 또는 R; X ₃ = D, Y 또는 L; X ₄ = L, R, S, 또는 G; X ₅ = A, V, S 또는 Y; X ₆ = R, E, G 또는 S; X ₇ = Y, M, L 또는 G; X ₈ = N, H, Y	7

[0141]

		또는 없음; $X_9 = Q, D$ 또는 없음; $X_{10} = W, A, D$ 또는 없음; $X_{11} = L, F, R$ 또는 없음; $X_{12} = A, D, G$ 또는 없음; $X_{13} = D, I, M$ 또는 없음; $X_{14} = D$ 또는 없음; 및 $X_{15} = V$ 또는 없음	
VH-CDR3 대안 2	$X_1X_2DX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$	$X_1 = T$ 또는 A ; $X_2 = T$ 또는 R ; $X_3 = L$ 또는 R ; $X_4 = A$ 또는 V ; $X_5 = R$ 또는 E ; $X_6 = Y$ 또는 M ; $X_7 = N$ 또는 없음; $X_8 = Q$ 또는 없음; $X_9 = W$ 또는 없음; $X_{10} = L$, 또는 없음; $X_{11} = A$, 또는 없음; $X_{12} =$ D 또는 없음	8
VL-CDR1 대안 1	$CX_1GSSSNIGX_2X_3YX_4X_5X_6$	$X_1 = T$ 또는 S ; $X_2 = A$ 또는 S ; $X_3 = G$ 또는 N ; X_4 $= D$ 또는 V ; $X_5 = V$ 또는 Y ; $X_6 = H$ 또는 없음	9
VL-CDR1 대안 2	CTGSSSNIGAGYDVH		10
VL-CDR2 대안 1	$X_1NX_2X_3RPS$	$X_1 = G, R$, 또는 D ; $X_2 =$ D, N , 또는 S ; 및 $X_3 = N$, Q 또는 K	11
VL-CDR2 대안 2	$X_1NX_2X_3RPS$	$X_1 = G$ 또는 R ; $X_2 = D$ 또는 N ; 및 $X_3 = N$ 또는 Q	12
VL-CDR3 대안 1	$CX_1X_2X_3DX_4SLX_5GX_6VX_7$	$X_1 = A$ 또는 Q ; $X_2 = V, A$ 또는 S ; $X_3 = W$ 또는 Y ; $X_4 = D$ 또는 S ; $X_5 = N$ 또는 S ; $X_6 = V, W$ 또는 P ; 및 $X_7 = V$ 또는 없음	13
VL-CDR3 대안 2	$CAX_1WDDSLNGX_2V$	$X_1 = V$ 또는 A ; 및 $X_2 = V$ 또는 W	14

[0142]

[0143]

[표 2]

특정 항-CTLA-4 항체 분자; CDR 서열은 전체 VH 서열 및 VL 서열에서 볼드체로 표시됨

항체 클론	영역	서열	서열 번호
4-E03	VH- CDR1	FSDYYMSWVR QAPG	15
	VH- CDR2	SGISWSSRDK GYADSVKGR	16
	VH- CDR3	TTDLARY	17
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	GNDNRPS	18
	VL-CDR3	CAVWDDSLNG VV	19
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS	20
		DYYMSWVRQA PGKGLEWVSG ISWSSRDKGY	
		ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED	
		TAVYYCT TDL ARYWGQGLV TVSS	
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI SCTGSSSNIG	21
		AGYDVHWYQQ LPGTAPKLLI YGNDNRPSGV	
		PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYYC	
		AVWDDSLNGV VFGGGTKLTV LG	
	인간 면역 글로블린 G1(IgG1) 경쇄(LC)	MGWSCILFLVATAIGVHS QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTG SSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNDNRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	53
	인간 IgG1 중쇄 (HC)	MGWSCILFLVATAIGVHSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSSRDKGYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTDLARYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	54
5-B07	VH-	FSSYSMNWVRQ APG	22

[0144]

	CDR1				
	VH- CDR2	SAISGSGGST YYADSVKGR			23
	VH- CDR3	ARDRVEMNQW LAD			24
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH			10
	VL-CDR2	RNNQRPS			25
	VL-CDR3	CAAWDDSLNG WV			26
	VH	EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	27
		SYSMNWVRQA	PGKGLEWVSA	ISGSGGSTYY	
		ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
		TAVYYCARDR	VEMNQWLADW	GQGTLLTVSS	
	VL	QSVLTQPPSA	SGTPGQRTI	SCTGSSSNIG	28
		AGYDVHWYQQ	LPGTAPKLLI	YRNNQRPSGV	
		PDRFSGSKSG	TSASLAISGL	RSEDEADYYC	
		AAWDDSLNGW	VFGGGLTLV LG		
	뮤린 면역글로 불린(IgG 2a) 경쇄(LC)	MGWSCILFLVATATGVHSEQSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGS SSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGLTL VLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCITDFYPGVVTVDW KVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMASSYLTLTARAWERHS SYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS			62
	뮤린 면역글로 불린(IgG 2a) 중쇄(HC)	MGWSCILFLVATATGVHSEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRVEMNQWL ADWQGQTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNL LGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWV FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFK CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQV TLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYF MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K			63
2-C06	VH- CDR1	FSSYAMSWVRQ APG			29
	VH- CDR2	SGISGSGGYI HYADSVKGR			30
	VH-	ATYSSGLHDA FDI			31

[0145]

	CDR3			
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH		10
	VL-CDR2	DNNKRPS		32
	VL-CDR3	CAAWDDSLNG WV		26
	VH	EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS
		SYAMSWVRQA	PGKGLEWVSG	ISGSGGYIHY
		ADSVKGRFTI	SRDNSKNILY	LQMNSLRAED
		TAVYYCATYS	SGLHDAFDIW	GQGTILTVSS
	VL	QSVLTQPPSA	SGTPGQRTI	SCTGSSSNIG
		AGYDVHWYQQ	LPGTAPKLLI	YDNNKRPSGV
		PDRFSGSKSG	TSASLAISGL	RSEDEADYYC
		AAWDDSLNGW	VFGGGTKLTV LG	
2-F09	VH-CDR1	FKAYSMWIR QAPG		35
	VH-CDR2	SGISNTGGST DFADSVKGR		36
	VH-CDR3	ARLGYSGYDD RGMDV		37
	VL-CDR1	CSGSSSNIGS NYVY		38
	VL-CDR2	GNSNRPS		39
	VL-CDR3	CQSYDSSLG PVV		40
	VH	EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFK
		AYSMSWIRQA	PGKGLEWVSG	ISNTGGSTDF
		ADSVKGRFTI	SRDNSKNILY	LQMNSLRAED
		TAMYVCARLG	YSGYDDRGMD	VWGQGTILTV SS
	VL	QSVLTQPPSA	SGTPGQRTI	SCSGSSSNIG
		SNVYVWYQQL	PGTAPKLLIY	GNSNRPSGVP
		DRFSGSKSGT	SASLAISGLR	SEDEADYYCQ
		SYDSSLGSPV	VFGGGTKLTV LG	

[0146]

[0147]

일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CTLA-4 항체 분자는 하기 표 3에 제공된 불변 영역 중 하나 또는 둘 다를 또한 포함할 수 있다.

[0148]

[표 3]

본원에 개시된 항체의 불변 영역의 서열

영역	서열	서열 번호
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	43
CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETITPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	44

[0149]

[0150]

일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체 분자는 하기 표 4에 제공된 뉴클레오티드 서열 중 하나에 의해서 인코딩된 분자이다.

[0151] [표 4]

항-CTLA-4 항체 분자를 인코딩하는 특정 뉴클레오타이드 서열

클론	인코딩	서열	서열 번호
4-E03 $\gamma 1$ 중쇄	4-E03 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCT ACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC CGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGCATTAGTTGGAGT AGTCGTGACAAAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGTT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATT ACTGTACCAAGATCTCGCTAGGTACTGGGGCCAGGTAC ACTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAAACAAAG CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTA CAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT GA	45

[0152]

4-E03 λ 중쇄	4-E03 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCC AACATCGGGGCAGGTTATGATGTACTGTTATCAGCAGC TCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAATGAT AACCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCAA GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGT CCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATGA CAGCCTGAATGGTGTGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTG ACGGTCTTAGGTACAGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCT GTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA CACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGG GAGTGGAGACCACACACCTCCAAACAAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATG AAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATG TTCATGA	46
5-B07 γ1 중쇄	5-B07 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT ACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGT GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATT ACTGTGCGAGAGATCGGGTAGAGATGAACAGTGGCTGGC CGACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCC TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGA ACTCAGCGGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCT GTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGC CCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCA	47

[0153]

		CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA	
5-B07 λ 경쇄	5-B07 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGGGTCACCATCTCTGCACTGGGAGCAGCTCC AACATCGGGGCAGGTTATGATGTACTGGTATCAGCAGC TCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGGAATAAT CAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCAA GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGT CCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGA CAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTG ACGGTCTAGGTACGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCT GTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGCCA CACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGG GAGTGGAGACCACACCCCTCAAACAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAG TGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATG AAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATG TTCATGA	48
2-C06 γ1 중쇄	2-C06 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT ACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGCAGC GGTGGGTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATT ACTGTGCGACCTATAGCAGTGGCCTGCATGATGCTTTTGAT ATCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC	49

[0154]

		TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT CCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAATGA	
2-C06 경쇄	λ 2-C06 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCC AACATCGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGC TCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGACAATAAT AAGCGACCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCAA GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTCCGGT CCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGA CAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTG ACGGTCTAGGTACAGCCCAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCT GTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGCCA CACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGG GAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATG AAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATG TTCATGA	50

2-F09 $\gamma 1$ 중쇄	2-F09 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT ACCTTCAAAGCCTATAGCATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATCAGTAACACG GGAGGTAGCACAGACTTCGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCATGTATT ACTGTGCGAGATTGGGATATAGTGGCTACGACGACCGTGG TATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGC TCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGC TGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGCGGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGT CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCGGAGAGACAACCTACAAGACCACGCTCTCCGTGTGGAC TCCGACGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA	51
------------------------	----------	--	----

[0156]

2-F09 λ 경쇄	2-F09 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCA ACATCGGAAGTAATTATGTGTACTGGTATCAGCAGCTCCA GGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATC GGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT GGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTCCGGTCCGA GGATGAGGCTGATTATTAAGTCCAGTCTATGACAGCAGCC TGAGTGGTCTGTGGTATTCTGGCGGAGGAACCAAGCTGAC GGTCTAGGTACGCCAAGGCTGCCCCCTCGTCACTCTGT TCCGCCCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA CTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGAC AGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGCGGGA GTGGAGACCACCACCCCTCAAACAAAGCAACAACAAGT ACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGTGCCAGGTACGCATGAA GGGAGCACCGTGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTT CATGA	52
-----------------------	----------	---	----

[0157]

[0158]

일부 구현예에서, 인간 CTLA-4(hCTLA-4) 및 게잡이원숭이(cynomolgus monkey) CTLA-4(cmCTLA-4 또는 cyno CTLA-4) 둘 다에 결합하는 항체 분자가 이롭다. 크랩-이팅 마카크(crab-eating macaque) 또는 마카카 파시쿨라 리스(Macaca fascicularis)라고 지칭되는 게잡이원숭이의 세포에서 발현되는 CTLA-4와의 교차 반응성이 이로울 수 있는데, 그 이유는 이것이 특히 내성에 초점을 맞춘 대리 항체를 사용하지 않고도 원숭이의 항체 분자를 시험할 수 있게 하기 때문이다.

[0159]

일부 구현예에서, 항체 분자는 인간 CTLA-4(hCTLA-4) 및 무린 CTLA-4(mCTLA-4) 둘 다에 결합하는 것이 이롭다. 이것은 대리 항체를 사용하지 않고도 효과 및 약력학에 특히 초점을 맞춘 마우스에서 항체 분자를 시험할 수 있기 때문에 이로울 수 있다.

- [0160] 일부 구현예에서, 항체 분자는 3개의 hCTLA-4, cmCTLA-4 및 mCTLA-4 모두에 결합한다.
- [0161] 일부 구현예에서, 마우스의 관련 생체 내 모델에서 항체 분자의 기능적 활성을 시험하기 위해 대리 항체를 사용하는 것이 필요하다. 인간에서 항체 분자의 효과와 마우스에서 대리 항체에 대한 생체 내 결과 간의 비교 가능성을 보장하기 위해서, 인간 항체 분자와 동일한 시험관 내 특성을 갖는 기능적으로 동등한 대리 항체를 선택하는 것이 필수적이다.
- [0162] 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자는 인간 CD28에 결합하지 않는다.
- [0163] 본원에 논의된 바와 같이, 제2 항체는 PD-1에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 항-PD-1 항체의 하기 비제한적인 예들 중 하나 이상으로부터 선택된다:
- [0164] • 펌브롤리주맵(Pembrolizumab)(현재 사용을 위해 승인됨);
 - [0165] • 니볼루맵(Nivolumab)(현재 사용을 위해 승인됨);
 - [0166] • 세미플리맵(Cemiplimab)(현재 사용을 위해 승인됨);
 - [0167] • 캄렐리주맵(Camrelizumab)(현재 사용을 위해 승인됨);
 - [0168] • 스파르탈리주맵(Spartalizumab)(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0169] • 도스타리맵(Dostarlimab)(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0170] • 테스렐리주맵(Tislelizumab)(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0171] • JTX-4014(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0172] • 신틸리맵(Sintilimab)(Sintilimab)(IBI308)(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0173] • 토리파리맵(Toripalimab)(JS 001)(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0174] • AMP-224(현재 임상 개발 중에 있음);
 - [0175] • AMP-514(MEDI0680)(현재 임상 개발 중에 있음).
- [0176] 바람직한 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체는 펌브롤리주맵, 니볼루맵, 세미플리맵, 또는 캄렐리주맵이다. 일부 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체는 이들 항체 중 둘 이상의 조합이다. 바람직한 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체는 펌브롤리주맵이다.
- [0177] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 분자는 인간 항체 분자이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 분자는 인간화 항체 분자이다.
- [0178] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 분자는 인간 기원의 항체 분자인데, 이는 그것이 인간 항체 분자로부터 유래되고, 이어서 변형되었다는 것을 의미한다.
- [0179] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 분자는 인간 IgG1 항체이다.
- [0180] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 하나 또는 몇몇의 활성 Fc 수용체에 대해서 향상된 결합을 나타내고/내거나 하나 또는 몇몇 활성 Fc 수용체에 대한 향상된 결합을 위해서 조작된 인간 IgG1 항체의 형태의 항체이고; 따라서, 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 Fc-조작된 인간 IgG1 항체이다.
- [0181] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 뮤린 또는 인간화 뮤린 IgG2a 항체이다.
- [0182] 일부 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자는 인간 항체 분자, 인간화 항체 분자, 및 인간 기원의 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0183] 일부 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자는 전체-크기 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 및 이의 항원-결합 단편(예를 들어, Fab, Fv, scFv, Fab' 및 (Fab')₂)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0184] 일부 구현예에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자는 인간 IgG 항체, 인간화 IgG 항체 및 인간 기원의 IgG 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0185] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 인간 PD-1와 교차 반응성인 무린 항체이다.
- [0186] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 단일클론 항체 또는 단일클론 기원의 항체 분자이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 다클론 항체이다.
- [0187] 일부 구현예에서, 제2 항체 분자는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 항-PD-L1 항체의 하기 비제한적인 예들 중 하나 이상으로부터 선택된다:
- [0188]  아테졸리주맵(Atezolizumab)(현재 사용을 위해 승인됨);
- [0189]  두르발루맵(Durvalumab)(현재 사용을 위해 승인됨);
- [0190]  아벨루맵(Avelumab)(현재 사용을 위해 승인됨);
- [0191]  CS1001(현재 임상 개발 중에 있음);
- [0192]  KN035(엔바폴리맵(Envafolimab))-미국, 중국, 및 일본에서 현재 임상 평가 하에 있는 피하 제형의 PD-L1 항체;
- [0193]  CK-301(현재 체크포인트 치료제에 의한 임상 개발 중에 있음)
- [0194] 바람직한 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체는 아테졸리주맵, 두르발루맵, 또는 아벨루맵이다. 일부 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체는 이들 항체 중 둘 이상의 조합이다.
- [0195] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 분자는 인간 항체 분자이다.
- [0196] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 분자는 인간화 항체 분자이다.
- [0197] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 분자는 인간 기원의 항체 분자인데, 이는 그것이 인간 항체 분자로부터 유래되고, 이어서 변형되었다는 것을 의미한다.
- [0198] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 분자는 인간 IgG1 항체이다.
- [0199] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 하나 또는 몇몇의 활성 Fc 수용체에 대해서 향상된 결합을 나타내고/내거나 하나 또는 몇몇 활성 Fc 수용체에 대한 향상된 결합을 위해서 조작된 인간 IgG1 항체의 형태의 항체이고; 따라서, 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 Fc-조작된 인간 IgG1 항체이다.
- [0200] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 무린 또는 인간화 무린 IgG2a 항체이다.
- [0201] 일부 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자는 인간 항체 분자, 인간화 항체 분자, 및 인간 기원의 항체 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0202] 일부 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자는 전체-크기 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 및 이의 항원-결합 단편(예를 들어, Fab, Fv, scFv, Fab' 및 (Fab')₂)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0203] 일부 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자는 인간 IgG 항체, 인간화 IgG 항체 및 인간 기원의 IgG 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0204] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인간 PD-L1와 교차 반응성인 무린 항체이다.
- [0205] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 단일클론 항체 또는 단일클론 기원의 항체 분자이다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 다클론 항체이다.
- [0206] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스를 포함한다.
- [0207] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “종양용해성”은 비-분열(예를 들어, 정상 또는 건강한) 세포에서는 복제가 없거나 최소한으로 나타내면서, 시험관내 또는 생체내에서 성장을 늦추고/늦추거나 분열하는 세포를 용해시킬 목적으로 분열 세포(예를 들어, 암 세포와 같은 증식 세포)에서 선택적으로 복제하는 바이러스의 능력을

지칭한다.

- [0208] “복제”(또는 “복제” 및 “복제하는” 등과 같은 복제의 임의의 형태)는 핵산 수준에서 또는 바람직하게는 감염성 바이러스 입자 수준에서 발생할 수 있는 바이러스의 복제를 의미한다. 이러한 종양용해성 바이러스는 현재 식별된 임의의 바이러스 구성원으로부터 얻을 수 있다. 이는 자연적으로 종양용해성이거나 DNA 복제, 핵산 대사, 숙주 항성, 표면 부착, 독성, 용해 및 확산에 관련된 것과 같은 분열 세포에서 종양 선택성 및/또는 우선적 복제를 증가시키도록 하나 이상의 바이러스 유전자를 변형시킴으로써 조작될 수 있는 네이티브 바이러스 일 수 있다(예를 들어, 문헌[Wong et al., 2010, Viruses 2: 78-106] 참고). 이벤트 또는 조직-특이적 조절 요소(예를 들어, 프로모터)의 제어 하에 하나 이상의 바이러스 유전자(들)를 배치하는 것도 고려할 수 있다.
- [0209] 예시적인 종양용해성 바이러스에는 제한 없이 레오바이러스; 세네카밸리(Seneca Valley) 바이러스(SV); 수포성 구내염 바이러스(VSV); 뉴캐슬병(Newcastle disease) 바이러스(NDV); 단순 포진 바이러스(HSV); 홍역 바이러스(morbillivirus); 아테노바이러스; 수두 바이러스; 레트로바이러스; 홍역 바이러스(measles virus); 거품형성 바이러스(foamy virus); 알파 바이러스; 렌티바이러스; 인플루엔자 바이러스; 신비스 바이러스(Sinbis virus); 점액종 바이러스; 라브도바이러스(rhabdovirus); 피코르나바이러스; 콕사키바이러스; 파르보바이러스 등이 포함된다. 이러한 바이러스는 의학 및 바이러스학 분야의 당업자에게 공지되어 있다.
- [0210] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 헤르페스 바이러스로부터 얻어진다. 헤르페스비리대(Herpesviridae)는 모두 공통 구조를 공유하고 지질 이중층 막으로 둘러싸인 20면체 캡시드 내에 캡슐화된 100 내지 200개의 유전자를 인코딩하는 비교적 큰 이중 가닥 선형 DNA 게놈으로 구성된 DNA 바이러스의 큰 패밀리아다. 종양용해성 헤르페스 바이러스는 다른 유형의 HSV에서 유래할 수 있지만, 특히 바람직한 것은 HSV1 및 HSV2이다. 헤르페스 바이러스는 종양에서 바이러스 복제를 제한하거나 분열되지 않는 세포에서 세포독성을 줄이기 위해 유전적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 티미딘 키나제(문헌[Martuza et al., 1991, Science 252: 854-6]), 리보뉴클레오타이드 리덕타제(RR)(문헌[Mineta et al., 1994, Cancer Res. 54: 3363-66]) 또는 우라실-N-글리코실라제(문헌[Pyles et al., 1994, J. Virol. 68: 4963-72])와 같은 핵산 대사에 관련된 임의의 바이러스 유전자는 불활성화될 수 있다. 또 다른 양상은 ICP34.5 유전자와 같은 독성 인자를 인코딩하는 유전자의 기능에 결함이 있는 바이러스 돌연변이체를 포함한다(문헌[Chambers et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1411-5]). 종양용해성 헤르페스 바이러스의 대표적인 예에는 NV1020(예를 들어, 문헌[Geevarghese et al., 2010, Hum. Gene Ther. 21(9): 1119-28]) 및 T-VEC(문헌[Harrington et al., 2015, Expert Rev. Anticancer Ther. 15(12):1389-1403])이 포함된다.
- [0211] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 아테노바이러스로부터 취득된다. 종양용해성 아테노바이러스를 조작하는 방법은 당업계에서 이용 가능하다. 유리한 전략은 바이러스 프로모터를 종양-선택적 프로모터로 대체하거나 E1 아테노바이러스 유전자 산물을 변형하여 종양 세포에서 변경된 p53 또는 망막 모세포종(Rb: retinoblastoma) 단백질과의 결합 기능을 불활성화시키는 것을 포함한다. 자연적인 맥락에서, 아테노바이러스 E1B55kDa 유전자는 다른 아테노바이러스 생성물과 협력하여 p53을 불활성화(p53은 암세포에서 자주 이상조절됨)시켜 세포 사멸을 예방한다. 종양용해성 아테노바이러스의 대표적인 예는 ONYX-015(예를 들어, 문헌[Khuri et al., 2000, Nat. Med 6(8): 879-85]) 및 온코린(Oncorine)이라고도 지칭되는 H101(문헌[Xia et al., 2004, Ai Zheng 23(12): 1666-70])을 포함한다.
- [0212] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 수두 바이러스이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “수두 바이러스”는 포스비리대 패밀리에 속하는 바이러스를 지칭하고, 특히 바람직하게는 코르도포스비리대 서브패밀리에 속하는 수두 바이러스, 더욱 바람직하게는 오르토폭스 바이러스 속에 속하는 바이러스를 지칭한다. 백시니아 바이러스, 우두 바이러스(cowpox virus), 카나리아두 바이러스, 엑트로멜리아 바이러스, 점액종 바이러스가 본 발명의 맥락에서 특히 적절하다. 이러한 수두 바이러스의 게놈 서열은 당업계 및 전문 데이터베이스(예를 들어, 각각 Genbank 수탁 번호 NC_006998, NC_003663 또는 AF482758.2, NC_005309, NC_004105, NC_001132)에서 입수 가능하다.
- [0213] 구체적이고 바람직한 구현예에서, 이러한 종양용해성 수두 바이러스는 종양용해성 백시니아 바이러스이다. 백시니아 바이러스는, 바이러스가 숙주 세포 기구와 독립적으로 복제할 수 있도록 하는 수많은 바이러스 효소 및 인자를 인코딩하는 200kb의 이중 가닥 DNA 게놈을 특징으로 하는 수두 바이러스 패밀리의 구성원이다. 백시니아 바이러스 입자의 대부분은 단일 지질 외피를 가진 세포내(세포내 성숙 비리온의 경우 IMV)에 존재하며, 용해될 때까지 감염된 세포의 세포질에 남아 있다. 다른 감염성 형태는 감염된 세포를 용해시키지 않고 그것으로부터

터 발아하는(buding out) 이중 외피 입자(세포외 외피 비리온의 경우 EEV)이다. 이는 임의의 백시니아 바이러스 군주에서 유래할 수 있지만 엘스트리(Elstree), 와이어스(Wyeth), 코펜하겐(Copenhagen), 리스트어(Lister) 및 웨스턴 리저브(Western Reserve) 군주가 특히 바람직하다. 본원에 사용된 유전자 명명법은 달리 명시되지 않는 한 코펜하겐 백시니아 군주의 명명법이다. 그러나 코펜하겐과 다른 백시니아 군주 간의 관련성은 일반적으로 문헌에서 입수 가능하다.

[0214] 바람직하게는, 이러한 종양용해성 백시니아 바이러스는 하나 이상의 바이러스 유전자(들)를 변경시킴으로써 변형된다. 상기 변형(들)은 바람직하게는 합성의 부재 또는 변형되지 않은 유전자에 의해 정상 조건 하에서 생산된 단백질의 활성을 보장할 수 없는 결함이 있는 바이러스 단백질의 합성으로 이어진다. DNA 대사, 숙주 독성, IFN 경로(예를 들어, 문헌[Guse et al., 2011, Expert Opinion Biol. Ther.11(5): 595-608]) 등에 관여하는 바이러스 유전자를 변경시키기 위한 목적의 예시적인 변형은 문헌에 개시되어 있다. 바이러스 유전자좌를 변경시키기 위한 변형은 바이러스 유전자 또는 이의 조절 요소 내에서 하나 이상의 뉴클레오타이드(들)(인접하든 아니든)의 결실, 돌연변이 및/또는 치환을 포함한다. 변형(들)은 통상적인 재조합 기술을 사용하여 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 이루어질 수 있다.

[0215] 보다 바람직하게는, 이러한 종양용해성 백시니아 바이러스는 티미딘 키나제 인코딩 유전자(유전자좌 J2R)를 변경함으로써 변형된다. 티미딘 키나제(TK) 효소는 데옥시리보뉴클레오타이드 합성에 관여한다. TK는 정상 세포에서 바이러스 복제에 필요한데, 그 이유는 이러한 세포가 일반적으로 낮은 농도의 뉴클레오타이드를 가지는 반면, 높은 뉴클레오타이드 농도를 포함하는 분열하는 세포에는 필요하지 않기 때문이다.

[0216] 대안적으로 또는 조합하여, 이러한 종양용해성 백시니아 바이러스는 리보뉴클레오타이드 리덕타제(RR)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자 또는 두 유전자 모두를 변경시킴으로써 변형된다. 자연적인 맥락에서, 이러한 효소는 리보뉴클레오타이드를 DNA 생합성에서 중요한 단계를 나타내는 데옥시리보뉴클레오타이드로 환원시키는 것을 촉매한다. 바이러스 효소는 포유동물 효소와 소단위 구조가 유사한데, 이것은 I4L 및 F4L 유전자좌에 의해 각각 인코딩된 R1 및 R2로 지정된 2개의 이중 소단위로 구성된다. 본 발명의 맥락에서, I4L 유전자(R1 큰 소단위를 인코딩함) 또는 F4L 유전자(R2 작은 소단위를 인코딩함) 중 어느 하나 또는 둘 다는 불활성화될 수 있다(예를 들어, 국제 특허 제W02009/065546호 및 문헌[Foloppe et al., 2008, Gene Ther., 15: 1361-71]에 기재된 바와 같음). J2R, I4L 및 F4L 유전자의 서열과 다양한 수두 바이러스의 게놈 내 위치는 공개 데이터베이스에서 입수 가능하다.

[0217] 따라서, 일부 구현예에서, 종양용해성 바이러스는 티미딘 키나제(TK) 및/또는 리보뉴클레오타이드 리덕타제(RR) 활성에 결함이 있다. 일부 구현예에서, 종양용해성 바이러스는 티미딘 키나제(TK) 및/또는 리보뉴클레오타이드 리덕타제(RR) 활성에 결함이 있는 백시니아 바이러스이다.

[0218] 일부 구현예에서, 종양용해성 바이러스는 본원에 정의된 바와 같은 제1 항체 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0219] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 2에 제시된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 2에 제시된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 2에 제시된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 2에 제시된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0220] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 20 및 서열번호 21을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 27 및 서열번호 28을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 33 및 서열번호 34를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 41 및 서열번호 42를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0221] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 4에 제시된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 4에 제시된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 4에 제시된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 상기 표 4에 제시된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

- [0222] 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 45 내지 52로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 45 및 46을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 47 및 48을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 49 및 50을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 서열번호 51 및 52를 포함한다.
- [0223] 일부 종양용해성 바이러스는 전장 인간 항체 서열의 통합을 수용할 수 있을만큼 충분히 큰 DNA 삽입을 호스팅하는 능력을 갖는다. 약독화 백시니아 바이러스 및 단순 헤르페스 바이러스는 전장 IgG 항체 서열의 통합을 허용할만큼 게놈이 충분히 큰 치료용 종양용해성 바이러스의 예이다(문헌[Chan and McFadden 2014, Bommarreddy, Shettigar et al. 2018]). 전장 IgG 항체는 종양용해성 백시니아 바이러스에 성공적으로 통합되어 바이러스에 민감한 숙주 세포, 예를 들어, 암 세포의 감염 시 전장 IgG 항체의 발현 및 세포외 방출(생산)을 초래한다(문헌[Kleinpeter, et al. 2016]). 아데노바이러스는 또한 세포 감염 시 기능적으로 생산되고 분비되는 전장 IgG 항체를 인코딩하도록 조작될 수 있다(문헌[Marino et al. 2017]).
- [0224] 바람직한 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 (J2R 유전자좌의 변경으로 인해서) TK 활성화에 결함이 있거나 또는 (J2R 유전자좌 및 RR-인코딩 I4L 및/또는 F4L 유전자좌 중 적어도 하나의 변경으로 인해서) TK 및 RR 활성화 모두에 결함이 있고, (a) 서열번호 20 및 서열번호 21을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 (b) 서열번호 27 및 서열번호 28을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 (c) 서열번호 33 및 서열번호 34를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 (d) 서열번호 41 및 서열번호 42를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 수두 바이러스(예를 들어, 백시니아 바이러스)이다.
- [0225] 일부 구현예에서, TK 및 RR 활성화는 관련 유전자좌(즉, J2R, I4L 및/또는 F4L 유전자좌) 내에서 제1 항체 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 도입에 의해 중단될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 바이러스는 바이러스 J2R 유전자좌에 삽입된 제1 항체 분자의 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/하거나 바이러스 I4L 유전자좌에 삽입된 제1 항체 분자의 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0226] 적절한 경우, 본원에 기재된 종양용해성 바이러스에 삽입된 뉴클레오타이드 서열(들)이 발현, 트래피킹 및 생물학적 활성을 촉진시키기 위한 추가 조절 요소를 포함하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 생산자 세포(예를 들어, 감염된 세포) 외부의 분비를 촉진하기 위해 신호 펩티드가 포함될 수 있다. 신호 펩티드는 전형적으로 Met 개시제 직후에 인코딩된 폴리펩티드의 N-말단에 삽입된다. 신호 펩티드의 선택은 광범위하고 당업자가 접근 가능하다. 예를 들어, 다른 면역글로빈(예를 들어, 중쇄 IgG)으로부터 유래된 신호 펩티드는 생산자 세포 외부에서 본원에 기재된 항-CTLA4 항체의 분비를 허용하기 위해 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 설명을 위해, IgG-유래 펩티드 신호가 장착된 본원에 기재된 4-E03 항체의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 서열번호 53 및 서열번호 54를 참조할 수 있다.
- [0227] 특히 바람직한 종양용해성 바이러스는 (J2R 유전자좌 및 I4L 유전자좌 모두의 변경으로 인해서) TK 및 RR 활성화 모두에 결함이 있고, 서열번호 20 및 서열번호 21 또는 서열번호 53 및 서열번호 54를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 백시니아 바이러스(예를 들어, 코펜하겐 균주)이다.
- [0228] 일부 구현예에서, 이러한 종양용해성 바이러스는 면역조절 폴리펩티드(들)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(들)(즉, 직접 또는 간접적으로 면역 반응을 자극하는 데 관여하는 폴리펩티드)과 같은 치료적 관심의 추가 뉴클레오타이드 서열(들)을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 면역조절 폴리펩티드의 대표적인 예는 어떠한 제한도 없이 과립구 대식세포 집락 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor: GM-CSF) 및 특히 인간, 비인간 영장류 또는 무린 GM-CSF에 대한 특정 선호도를 갖는 사이토카인 및 케모카인을 포함한다.
- [0229] 따라서, 일부 구현예에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스(예를 들어, 백시니아 바이러스)는 GM-CSF, 바람직하게는 인간 GM-CSF(예를 들어, 서열번호 55 또는 서열번호 56) 또는 무린 GM-CSF(예를 들어, 서열번호 57 또는 서열번호 58을 갖는)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다.
- [0230] 추가 뉴클레오타이드 서열은 당업계에서 접근 가능한 서열 데이터 및 본원에 제공된 정보를 사용하여 표준 분자 생물학 기술(예를 들어, PCR 증폭, cDNA 클로닝, 화학적 합성)에 의해 쉽게 획득될 수 있다. 특히 바람직한 종양용해성 바이러스는 (J2R 유전자좌 및 I4L 유전자좌 모두의 변경으로 인해서) TK 및 RR 활성화 모두에 결함이 있고, 서열번호 20 및 서열번호 21 또는 서열번호 53 및 서열번호 54를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 인간 GM-CSF(예를 들어, 서열번호 55 또는 서열번호 56을 가짐) 또는 무린 GM-CSF(예를 들어, 서열번호 57 또는 서열

번호 58을 가짐)에 대해서 특이적 선호도를 갖는 GM-CSF를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백시니아 바이러스(예를 들어, 코펜하겐 균주)이다.

[0231] 하기 표는 본원에 언급된 GM-CSF의 서열을 제공한다:

	서열	서열 번호
신호 캡티드가 없는 인간 GM-CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFD LQEPTCLQTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	55
신호 캡티드가 있는 인간 GM-CSF	MWLQSLLLGTVACISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLT MMASHYKQHCPPTPETS CATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQ E	56
신호 캡티드가 없는 류틴 GM-CSF	APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKK LTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDCET QVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK	57
신호 캡티드가 있는 류틴 GM-CSF	MWLQNLLFLGIVVYSLAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMP VTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMT ASYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK	58

[0232]

[0233] 또한, 이러한 종양용해성 바이러스에 삽입될 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 코돈(들)을 변형시킴으로써 특정 숙주 세포 또는 대상체에서 높은 수준의 발현을 제공하도록 최적화될 수 있다. 코돈 사용의 최적화에 더하여, 농축된 영역에 존재하는 희귀하고 최적이지 않은 코돈의 클러스터링을 방지하고/하거나 발현 수준에 부정적인 영향을 미칠 것으로 예상되는 “부정적인” 서열 요소를 억제 또는 변형시키기 위해 다양한 변형이 예상될 수 있다. 이러한 음성 서열 요소는 제한 없이 매우 높은(>80%) 또는 매우 낮은(<30%) GC 함량을 갖는 영역; AT-풍부 또는 GC-풍부 서열 스트레치; 불안정한 직접 또는 역위 반복 서열; R A 2차 구조체; 및/또는 내부 TATA-박스, chi-부위, 리보솜 진입 부위, 및/또는 스플라이싱 공여체/수용체 부위와 같은 내부 암호 조절 요소를 포함한다.

[0234]

일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열(들)은 숙주 세포 또는 대상체에서 적절한 발현을 위해 적절한 조절 요소의 제어 하에 배치된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “조절 요소”는 복제(replication), 중복(duplication), 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성 및/또는 발현 세포 내부 또는 외부에서의 수송을 포함하여 주어진 숙주 세포 또는 대상체에서 인코딩 뉴클레오티드 서열(들)의 발현을 허용, 기여 또는 조절하는 임의의 요소를 지칭한다. 당업자는 조절 요소의 선택이 뉴클레오티드 서열 자체, 그것이 삽입되는 바이러스, 숙주 세포 또는 대상체, 원하는 발현 수준 등과 같은 인자에 의존할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 프로모터는 특히 중요하다. 본 발명의 맥락에서, 그것은 많은 유형의 숙주 세포에서 제어하거나 특정 숙주 세포에 특이적으로 또는 특정 사건 또는 외인성 인자(예를 들어, 온도, 영양 첨가제, 호르몬 등)에 대한 반응으로 또는 바이러스 주기의 단계(예를 들어, 후기 또는 초기)에 따라서 조절되는 뉴클레오티드 서열의 구성적 지시 발현일 수 있다. 바이러스 매개 발현에 적합한 프로모터는 당업계에 공지되어 있다.

[0235]

종양용해성 수두 바이러스에 의한 발현에 대한 대표적인 예는 백시니아 p7.5K, pH5.R, p11K7.5, TK, p28, p11, pB2R, pA35R, K1L 및 pSE/L 프로모터(문헌[Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28; Orubu et al. 2012, PloS One 7: e40167]), 초기/후기 키메라 프로모터 및 합성 프로모터(문헌[Chakrabarti et al., 1997, Biotechniques 23: 1094-7; Hammond et al., 1997, J. Virol Methods 66: 135-8; and Kumar and Boyle, 1990, Virology 179: 151-8]). 바람직한 구현예에서, 본원에 기재된 항체의 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열은 각각 동일한 전사 강도를 갖는 프로모터의 제어 하에, 바람직하게는 동일한 프로모터(예를 들어, p7.5K, 예컨대, 서열번호 59에 기재된 것 또는 pH5.R, 예컨대, 서열번호 60에 기재된 것)의 제어 하에 배치되어 두 사슬에 대해 유사한 수준의 발현을 얻고, 따라서 이중-사량체 단백질로서 항체의 최적 어셈블리를

얻는다(즉, 비-연관 섹의 과량을 회피한다). 추가 뉴클레오티드 서열(예를 들어, GM-CSF를 인코딩함)은 다른 프로모터(예를 들어, 서열번호 61에 기재된 것과 같은 pSE/L) 아래에 배치될 수 있다.

[0236] 하기 표는 상기에 언급된 프로모터의 서열을 제공한다:

	서열	서열번호
프로모터 p7.5K	CCACCCACTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAATAC AATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTG CACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGT	59
프로모터 pH5.R	TTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAG GGTTGTGTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATT ATCGCGATATCCGTTAAGTTTG	60
프로모터 pSE/L	AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGAATATAAATA	61

[0237]

[0238] 이러한 종양용해성 바이러스의 계놈에 뉴클레오티드 서열(들)을 삽입하는 것은(가능하면 적절한 조절 요소가 장착됨)은 적절한 제한 효소를 사용하거나 바람직하게는 상동성 재조합에 의해 통상적인 수단에 의해 행해진다. 뉴클레오티드 서열(들)은 바이러스 계놈의 임의의 위치에 독립적으로 삽입될 수 있다. 다양한 삽입 부위, 예를 들어, 비-필수 바이러스 유전자, 유전자간 영역 또는 이러한 종양용해성 바이러스 계놈의 비-암호 부분 내가 고려될 수 있다. 특히 종양용해성 바이러스가 수두 바이러스(예를 들어, 종양용해성 백시니아 바이러스)인 경우 J2R 유전자좌 및/또는 I4L 유전자좌가 적합하다. 뉴클레오티드 서열(들)을 바이러스 계놈에 삽입하면 삽입 부위의 바이러스 유전자좌가 적어도 부분적으로 결실될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 결실 또는 부분 결실은 전체적으로 또는 부분적으로 결실된 유전자좌에 의해 인코딩된 바이러스 유전자 산물의 발현을 억제하여 상기 바이러스 기능에 대해 결함이 있는 바이러스를 초래할 수 있다. 특히 바람직한 종양용해성 바이러스는 J2R 유전자좌에 삽입된 중쇄를 인코딩하는 카세트, I4L 유전자좌에 삽입된 경쇄를 인코딩하는 카세트를 포함하는 TK 및/또는 RR에 결함이 있는 백시니아 바이러스이다. 추가 GM-CSF-인코딩 뉴클레오티드 서열을 인코딩하는 카세트는 바이러스 계놈의 다른 위치 또는 J2R 또는 I4L 유전자좌에 삽입될 수 있으며, I4L 유전자좌에서의 삽입이 바람직하다.

[0239] 본 발명은 또한 본원에 기재된 종양용해성 바이러스, 특히 종양용해성 수두 바이러스를 적합한 숙주 세포(생산자 세포) 내에서 생성시키는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 바이러스 계놈과, 삽입 부위의 상류 및 하류에 각각 존재하는 바이러스 서열을 갖는 5' 및 3'에서 측접된 삽입될 (가능하게는 조절 요소를 가지는) 뉴클레오티드 서열(들)을 포함하는 전달 플라스미드 사이의 상동성 재조합의 하나 이상의 단계(들)를 포함한다. 상기 전달 플라스미드는 일상적인 기술(예를 들어, 형질주입)에 의해 생성되고, 숙주 세포로 도입될 수 있다. 바이러스 계놈은 감염에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 각각의 측접 바이러스 서열의 크기는 뉴클레오티드 서열의 각 면에서 적어도 100bp에서 최대 1500bp까지 다양할 수 있다(바람직하게는 200bp 내지 550bp, 더 바람직하게는 250bp 내지 500bp). 이러한 종양용해성 바이러스를 생성시킬 수 있는 상동성 재조합은 바람직하게는 배양된 세포주(예를 들어, HeLa, Vero) 또는 발육란에서 얻은 닭 배아 섬유 아세포(chicken embryonic fibroblast: CEF) 세포에서 수행된다.

[0240] 일부 구현예에서, 항-CTLA4 인코딩 뉴클레오티드 서열 및 가능한 추가 뉴클레오티드 서열(예를 들어, GM-CSF)을 혼입한 종양용해성 바이러스의 식별은 선택 및/또는 검출 가능한 유전자의 사용에 의해 촉진될 수 있다.

[0241] 바람직한 구현예에서, 전달 플라스미드는 선택적 배지(예를 들어, 마이코페놀산, 잔틴 및 하이포잔틴의 존재 하에) 또는 검출 가능한 유전자에서 성장을 허용하는 GPT 유전자(구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제를 인코딩함)에 대한 특정 선택도를 갖는 선택 마커를 추가로 포함한다. 또한, 상기 선택 또는 검출 가능한 유전자에서 이중 가닥 절단을 제공할 수 있는 엔도뉴클레아제의 사용도 고려될 수 있다. 상기 엔도뉴클레아제는 단백질 형태이거나 발현 벡터에 의해 발현될 수 있다.

[0242] 일단 생성되면, 이러한 종양용해성 바이러스는 감염성 입자의 생성 및 회수를 허용하도록 적절한 조건 하에서 형질주입되거나 감염된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 통상적인 기술을 사용하여 적절한 숙주 세포 내에서 증폭될 수 있다.

[0243] 본 발명은 또한 본원에 기재된 종양용해성 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 방법은 a) 생산자 세포주를 제조하는 단계, b) 제조된 생산자 세포주에 종양용해성 바이러스를 형질주입 또는 감염

시키는 단계, c) 형질주입되거나 감염된 생산자 세포주를 바이러스의 생산을 허용하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계, d) 상기 생산자 세포주의 배양물로부터 생산된 바이러스를 회수하는 단계, 선택적으로 e) 상기 회수된 바이러스를 정제하는 단계를 포함한다.

- [0244] 일부 구현예에서, 생산자 세포는 HeLa 세포(예를 들어, ATCC-CRM-CCL-2TM 또는 ATCC-CCL-2.2TM), HER96, PER-C6(문헌[Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-17]), BHK-21(ATCC CCL-10) 등과 같은 햄스터 세포주 및 수정란으로부터 수득된 닭 배아로부터 제조된 1차 닭 배아 섬유아세포(CEF) 뿐만 아니라 W02005/042728, W02006/108846, W02008/129058, W02010/130756, W02012/001075에 기재된 것과 같은 조류 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 생산자 세포는 바람직하게는 필요한 경우 혈청 및/또는 적합한 성장 인자(들)가 보충될 수 있거나 보충되지 않을 수 있는 적절한 배지(예를 들어, 바람직하게는 동물 또는 인간 유래 생성물이 없는 화학적으로 정의된 배지)에서 배양된다. 적절한 배지는 생산자 세포에 따라 당업자가 쉽게 선택할 수 있다. 이러한 배지는 상업적으로 입수 가능하다. 생산자 세포는 바람직하게는 감염전 1일 내지 8일 동안 +30℃ 내지 +38℃(더 바람직하게는 대략 +37℃)에 포함된 온도에서 배양된다. 필요한 경우 총 세포 수를 늘리기 위해 1일 내지 8일 동안 여러 번 계대할 수 있다.
- [0245] 단계 b)에서, 생산자 세포를 생산자 세포의 생산적인 감염을 허용하기 위해 적절한 감염 다중도(multiplicity of infection: MOI)를 사용하여 적절한 조건에서 종양용해성 바이러스에 의해 감염시킨다. 예시 목적을 위해, 적절한 MOI는 10⁻³ 내지 20의 범위이며, 특히 바람직하게는 MOI는 0.01 내지 5, 보다 바람직하게는 0.03 내지 1을 포함한다. 감염 단계는 생산자 세포의 배양에 사용되는 배지와 동일하거나 상이할 수 있는 배지에서 수행된다.
- [0246] 단계 c)에서, 감염된 생산자 세포는 자손 바이러스 입자가 생산될 때까지 당업자에게 널리 공지된 적절한 조건 하에서 배양된다. 감염된 생산자 세포의 배양은 또한 바람직하게는 생산자 세포의 배양 및/또는 감염 단계에 사용되는 배지/배지와 동일하거나 상이할 수 있는 배지에서 +32℃ 내지 +37℃의 온도에서 1일 내지 5일 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [0247] 단계 d)에서, 단계 c)에서 생산된 바이러스 입자는 배양 상청액 및/또는 생산자 세포로부터 수집된다. 생산자 세포로부터의 회수는 생산자 세포막을 파괴하여 바이러스의 해방을 허용하는 단계를 필요로 할 수 있다. 생산자 세포막의 파괴는 동결/해동, 저장성 용해, 초음파 처리, 미세 유동화, 고전단(고속으로도 불림) 균질화 또는 고압 균질화를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당업자에게 널리 공지된 다양한 기술에 의해서 유도될 수 있다.
- [0248] 회수된 종양용해성 바이러스는 용량으로 분배되고 본원에 기재된 바와 같이 사용되기 전에 적어도 부분적으로 정제될 수 있다. 예를 들어, 정화, 효소 처리(예를 들어, 엔도뉴클레아제, 프로테아제 등), 크로마토그래피 및 여과 단계를 비롯한 다양한 정제 단계 및 방법이 당업계에서 이용 가능하다. 적절한 방법이 당업계에 기재되어 있다(예를 들어, W02007/147528; W02008/138533, W02009/100521, W02010/130753, W02013/022764 참조).
- [0249] 일 구현예에서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스에 감염된 세포를 제공한다.
- [0250] CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자와 PD-1 및/또는 PD-1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스의 조합은 암이 차가운 종양을 포함하거나 이로 이루어지는 환자에서 암의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0251] 본 발명자들은 대상체가 포유동물 또는 비-포유동물일 수 있다는 것을 포함한다. 바람직하게, 포유동물 대상체는 인간이거나 비-포유동물, 예컨대 말 또는 소, 또는 양, 또는 돼지 또는 낙타 또는 개 또는 고양이이다. 가장 바람직하게는, 포유동물 대상체는 사람이다.
- [0252] 환자는 암을 갖는 징후 또는 증상을 나타낼 수 있다. "나타낸다"에, 본 발명자들은 대상체가 암 증상 및/또는 암 진단 마커를 나타내고/내거나 암 증상 및/또는 암 진단 마커는 측정 및/또는 평가 및/또는 정량될 수 있음을 포함한다.
- [0253] 암 증상 및 암 진단 마커가 무엇인지, 암 증상의 중증도의 감소 또는 증가, 또는 암 진단 마커의 감소 또는 증가 여부를 측정 및/또는 평가 및/또는 정량하는 방법뿐 아니라 이들 암 증상 및/또는 암 진단 마커가 암에 대한 예후를 형성하는데 이용될 수 있는 방법은 의학 분야의 당업자에게 손쉽게 명백해질 것이다.

- [0254] 암 치료는 종종 치료 과정으로서 투여되는데, 즉 치료제가 일정 기간에 걸쳐 투여된다. 치료 과정의 시간은 다수의 인자에 따라 달라질 수 있으며, 여기에는 투여되는 치료제의 유형, 치료되는 암의 유형, 치료되는 암의 중증도 및 대상체의 연령 및 건강 상태, 그중에서도 이유가 포함될 것이다.
- [0255] "치료 중"에, 본 발명자들은 대상체가 현재 치료 과정을 제공받는 중이고/거나 치료제를 수여받는 중이고/거나 치료제 과정을 제공받는 중인 것을 포함한다.
- [0256] 상기 논의된 바와 같이, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자와 PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스의 조합은 암이 차가운 종양을 포함하거나 이로 이루어지는 환자에서 암의 치료에 특이적으로 사용하기 위한 것이다.
- [0257] 따라서, 일부 구현예에서, 차가운 종양은 제1 및 제2 항체 분자에 의해 처리된다.
- [0258] 당업자는 차가운 종양이 "치료"되었는지 여부를 결정하는 것이 다른 유형의 종양에 사용되는 것과 동일한 종류의 결정을 포함한다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 당업자는 CT 스캔을 사용하여 측정할 수 있는 종양 수축(주입된 종양 및 주입되지 않은 종양 모두에서), 및/또는 무진행 생존, 및/또는 전체 생존과 같은 징후를 찾을 것이다. 다른 경우에, 이는 대상체에 의해 보고된 증상의 중증도의 감소와 같은 보다 주관적인 효과일 수 있다. 치료 항체의 투여에 반응하여 대상체에서 치료 효과의 측정은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0259] "차가운 종양"은 염증성 면역 세포, 특히 T 세포 및 특히 CD8⁺ T 세포에 의해 잘 침윤되지 않는 종양을 지칭한다. 차가운 종양은 임상적으로 매우 관련이 있는데, 이는 종양 면역 침윤 및 특히 CD8⁺ T 세포 침윤이 상이한 조직학적 특징 및 해부학적 위치를 갖는 암에서 더 긴 무병 생존(DFS) 및/또는 전체 생존(OS)과 상관관계가 있는 것으로 널리 입증되었기 때문이다. 이는 흑색종, 대부분의 편평 세포암(SCC), 대세포 폐암 및 여러 유형의 선암을 포함한다(문헌[Galon et al., 2006; Fridman et al., 2012; Fridman et al., 2017; Hu et al., 2018]) 1차 및 전이성 환경(문헌[Bruni et al., 2020])에서 입증되었으며 ICB에 대한 반응성과 상관관계 및 예측이 가능하다(문헌[Galon and Bruni, 2019]).
- [0260] 예를 들어, 최근 CD8⁺ T 세포 밀도는 흑색종(문헌[Tumeh et al. 2014]), 신장 세포 암종(문헌[McDermott, Huseni et al. 2018]) 및 인간 고형암 환자의 NSCLC(문헌[Thommen, Koelzer et al. 2018])에서 항-CTLA-4 및 PD-1/PD-L1에 대한 항체를 사용하여 ICB에 대한 반응/진행과 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 유사하게, 전 임상 마우스 종양 모델은 면역 침윤에 대해 정량적으로 그리고 정성적으로 상이하고, B16/C57BL6 모델은 CD8⁺ T 세포를 포함하는 면역 세포 침윤과 관련하여 특히 부족하다는 것이 잘 알려져 있다(문헌[Mosely et al. 2017]). 또한, 인간 "차가운 종양"과 유사하게 B16/C57BL6 모델은 특히 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1/L1을 사용하는 전신 ICB에 내성이 있어 전신 ICB에 대한 "차가운 종양" 내성을 극복하는 데 도움이 되는 치료법을 식별하는 데 유용하다.
- [0261] PD-L1의 종양 세포, 면역 세포 또는 합성 세포 수준을 정량화하는 임상적으로 관련된 검정이 고안되었으며 임상에서 항-PD-1/L1 ICB 시약(예: 펄름블리주맙)으로 치료할 환자를 식별하는 데 도움이 되도록 사용된다(환자가 치료 대상으로 선택되는 방법을 설명하는 KEYTRUDA® 섹션 2.1 처방 정보 참조 - https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s0961b1.pdf에서 입수 가능).
- [0262] 다색 면역 형광에 기초한 최근의 데이터는, 침습 마진 CD8⁺ T 세포 밀도가 최상의 완전 예측 파라미터로서, 그리고 종양 CD8⁺ T 세포 밀도가 흑색종에서 PD-1 차단 요법에 대한 반응/진행의 두 번째로 우수한 예측 인자로서 확인되었다(문헌[Tumeh et al., 2014]). 또한, 주성분 분석은 CD8 침투, PD-1 및 PD-L1이 치료 결과와 유의한 상관관계가 있음을 보여주었다. 이러한 데이터는 CD8⁺ T 세포 밀도가 차가운 종양 환자를 식별하는 유용한 방법이 될 수 있음을 뒷받침한다. 최근 암 환자의 종양에서 CD3⁺ CD8⁺ T 세포 침윤을 발생 부위에서 정량화하기 위해 "면역 점수(Immunoscore)"라는 이름의 면역 기반 검정이 개발되었다(문헌[Bruni et al., 2020; Galon et al., 2006; Lanzi et al., 2020]).
- [0263] 면역 점수는 종양 내 CD3⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 밀도와 침습적 마진을 평가하는 면역조직화학 및 디지털 병리 기반 점수 시스템이다. 간략하게, 포르말린-고정, 파라핀-포매된 종양 블록의 2개의 인접한 슬라이드를 자동염색기(autostainer)에서 항-CD3 및 항-CD8 항체로 염색한다. 이어서, 슬라이드를 스캐닝하고 디지털 이미지를 사용하여 디지털 병리학 소프트웨어로 관심 세포의 밀도를 정량화한다. 밀도는 최종적으로 낮은 면역 점수(I0)에서

높은 면역 점수(I4)에 이르는 면역 점수로 변환된다.

- [0264] Galon과 Bruni는 면역 점수를 “뜨거운 종양과 차가운 종양”의 개념에 맞추는 접근법을 제안했다(문헌 [(Galon et al., 2019; Angell et al., 2020)]). 이 접근법을 사용하여, 종양은 T 세포 침윤에 따라 뜨거운 면역 종양; 변경된 면역억제 면역 종양; 변경-배제 면역 종양; 차가운 종양의 4가지 범주로 분류되었다.
- [0265] 이들 4가지 유형의 종양의 특징은 2019년 갈론(Galon) 등의 박스 1에 상세히 기재되어 있으며, 이는 다음과 같은 특징에 따른 종양 유형을 기술하고 있다:
- [0266] 1. 뜨거운 면역 종양(본원에서 뜨거운 종양으로도 지칭됨)
- [0267] - 높은 수준의 T세포 및 세포독성 T세포 침윤(높은 면역점수)
- [0268] - 체크포인트 활성화(예정 세포 사멸 단백질 1(PD-1)), 세포독성 T 림프구 관련 항원 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 유신 수용체 3(TIM-3) 및 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3)) 또는 기타 손상된 T 세포 기능(예: 세포외 칼륨에 의한 T 세포 억제)
- [0269] 2. 변경된 면역억제 면역 종양
- [0270] - 없지는 않지만, 불량한 T 세포 및 세포독성 T 세포 침윤(중간 면역 점수)
- [0271] - 가용성 억제 매개체의 존재(형질전환 성장 인자- β (TGF β), 인터루킨 10(IL-10) 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF))
- [0272] - 면역 억제 세포(골수-유래 억제 세포 및 조절 T 세포)의 존재
- [0273] - T 세포 체크포인트(PD-1, CTLA-4, TIM-3 및 LAG-3)의 존재
- [0274] 3. 변경-배제 면역 종양
- [0275] - 종양 베드 내부에서 T 세포 침윤 없음; 종양 경계(침습적 마진)에서 T 세포의 축적(중간 면역 점수)
- [0276] - 발암성 경로의 활성화
- [0277] - 종양 미세환경의 후생적 조절 및 재프로그래밍
- [0278] - 비정상적 종양 혈관구조 및/또는 간질
- [0279] - 저산소증
- [0280] 4. 차가운 면역 종양(본원에서 차가운 종양으로도 지칭됨)
- [0281] - 종양 내 및 종양 가장자리에 T 세포의 부재(낮은 면역 점수)
- [0282] - 실패한 T 세포 프라이밍(낮은 종양 돌연변이 부담, 불량한 항원 제시 및 T 세포 사멸에 대한 본질적인 둔감성).
- [0283] 따라서, 일부 구현예에서, 환자는 상기에 정의된 바와 같은 변경된 면역억제 면역 종양, 변경-배제 면역 종양, 또는 차가운 면역 종양의 정의에 적합한 종양을 갖는 경우, 차가운 종양을 갖는 것으로 간주된다.
- [0284] 각각의 상기 유형의 종양은 T 세포 체크포인트 억제에 대해 상이한 수준의 반응을 가질 것이며, 이때 가장 낮은 수준의 반응을 갖는 차가운 면역 종양(반응 없음), 변경-배제 면역 종양, 및 변경된 면역억제 면역 종양(차선 수준의 반응을 갖는)일 것이다.
- [0285] 본원에서 “차가운 종양”, 즉 면역 세포(예를 들어, CD3+ 및 CD8+ T 세포)에 의해 잘 침윤되지 않은 종양의 정의는 고전적인 차가운 면역, 변경-배제 및 변경-면역억제 종양을 모두 포함하는데, 이러한 범주는 모두 불량(면역 변경) 또는 부재(면역 배제 그리고 차가운) T 세포 침윤에 의해 정의되기 때문이다. 이는 면역 점수 I, II 또는 III를 가진 암 환자와 동등하지만 IV는 아니다(후자는 T 세포 염증 종양임). 이와 같이, 본 발명은 면역 점수 I, II 및 III를 갖는 환자에게 적용될 수 있지만 IV는 적용되지 않는다.
- [0286] 따라서, 일부 구현예에서, 종양이 I, 또는 II, 또는 III의 면역 점수를 갖는 경우, 환자는 차가운 종양을 갖는 것으로 간주된다.
- [0287] 당업자는 면역 점수 또는 T 세포 밀도 이외의 다른 검정 및 기술이 특히 내성이 있는 “차가운 유형”;

의 암을 식별하는 데 도움이 될 수 있음을 인지할 것이다.

- [0288] 일부 구현예에서, 차가운 종양은 면역 결핍(anergized)(또는 무력성(anergic)) 림프구를 갖는다. 이것은 림프구가 항원에 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 무력성 림프구를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0289] 일부 다른 구현예에서, 차가운 종양은 낮은 수준의 CD3 양성 세포를 갖는다. 예를 들어, 차가운 종양은 10% 미만의 CD3 양성 세포(종양에서 총 세포의 백분율), 즉 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만의 CD3 양성 세포를 가질 수 있거나, CD3 양성 세포가 없을 수 있다. CD3 양성 세포의 백분율을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0290] 상기 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 바와 같은 차가운 종양은 전형적으로 면역계에 의해 잘 표적화되지 않은 종양이다. 일부 대안적인 또는 추가적인 구현예에서, 이러한 차가운 종양은 또한 다음 유형으로 분류될 수 있다:
- [0291] - 면역 사멸된 종양, 즉 종양-침윤 T 세포의 부족으로 인해 종양에서 면역 반응이 전체적으로 부족하다.
 - [0292] - 면역 배제된 종양, 즉 반응성 T 세포가 생성되지만, 종양에 대한 반응을 일으키기 위해 종양에 침투할 수 없으며, T 세포는 종양 주변에 존재할 수 있다.
 - [0293] - 면역 침윤이 불량한 종양, 즉 종양 미세 환경으로의 면역 세포(T 세포)의 침투 수준이 감소한다.
- [0294] 본원에 사용되는 바와 같이, “차가운 종양”은 또한 면역 사멸된 종양, 면역 배제된 종양, 및 면역 침윤이 불량한 종양 모두를 포함한다. 이들 정의는 대안적으로 사용될 수 있고, 또는 추가로, 앞서 논의된 차가운 종양(변경-면역억제, 변경-배제, 또는 차가운 면역 종양으로서)의 정의들이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 변경된 면역억제 면역 종양은 면역 침윤이 불량한 종양에 대응한다. 일부 구현예에서, 변경-배제 면역 종양은 면역 배제된 종양에 대응한다. 일부 구현예에서, 차가운 면역 종양은 면역 사멸된 종양에 대응한다.
- [0295] “차가운 종양을 포함하거나 이로 구성되는”으로, 본 발명자들은 차가운 종양 및 비-차가운 종양으로 구성될 수 있는 암을 지칭한다. 예를 들어, 이는 원래의 암(차가운 종양일 수 있음)이 전이되고 차가운 종양이 아닌 2차 종양을 형성하는 경우 일어날 수 있다. 본원에서 환자는 다수의 종양을 가질 수 있으며, 이들 중 하나만이 본 발명이 유익하기 위해 차가운 종양의 요건을 충족하면 된다. 다른 구현예에서, 환자는 차가운 종양으로 간주되는 단일 종양을 가질 수 있다.
- [0296] 이러한 “차가운 종양” 아형에 속할 수 있는 암은 흑색종, 췌장암, 전립선암, 대장암, 간세포 암종, 폐암, 방광암, 신장암, 위암, 자궁경부암, 메르켈 세포 암종, 난소암, 두경부암, 중피종 또는 유방암을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.
- [0297] 각각의 상기 기술된 암들은 익히 공지되어 있으며, 이들 암을 치료하는데 사용된 치료제와 마찬가지로 증상 및 암 진단 마커가 잘 설명되어 있다. 따라서, 상기 언급된 암 유형을 치료하는데 사용된 치료제, 암 진단 마커 및 증상은 의학 분야의 당업자에게 공지되어 있을 것이다.
- [0298] 다수의 암의 진단, 예후 및 진행에 대한 임상적 정의는 병기결정(staging)으로서 공지된 특정한 분류에 좌우된다. 이들 병기결정 시스템은 암의 진단 및/또는 예후 및/또는 진행의 요약 제공을 위해 다수의 상이한 암 진단 마커 및 암 증상을 수집 분석하는 작용을 한다. 종양학의 당업자는 병기결정 시스템을 이용하여 암의 진단 및/또는 예후 및/또는 진행을 평가하는 방법 및 이를 위해 어떤 암 진단 마커 및 암 증상이 이용되어야 하는지 알고 있을 것이다.
- [0299] “암 병기결정”에, 단계 0, 단계 I, 단계 II, 단계 III 및 단계 IV를 포함하는 Rai 병기결정, 및/또는 단계 A, 단계 B, 및 단계 C를 포함하는 Binet 병기결정, 및/또는 단계 I, 단계 II, 단계 III 및 단계 IV를 포함하는, Ann Arbour 병기결정이 포함된다.
- [0300] 암은 세포의 형태에 이상을 야기시킬 수 있다는 것이 공지되어 있다. 이러한 이상은 종종 특정 암에서 재현 가능하게 발생하는데, 이는 이러한 형태 변화를 검사하는 것이 (다르게는, 조직학적 검사로서 공지됨) 암의 진단 또는 예후에 사용될 수 있다는 것을 의미한다. 세포의 형태를 검사하기 위해 샘플을 시각화하고 시각화를 위한 샘플을 준비하는 기술, 예를 들어 광학 현미경 또는 공초점 현미경이 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0301] “조직학적 검사”에, 본 발명자들은 작고, 성숙한 림프구의 존재, 및/또는 세포질의 좁은 경계를 가진 작고 성숙한 림프구의 존재, 식별가능한 핵이 부족한 치밀한 핵을 가진 작고 성숙한 림프구의 존재, 및/또는 세포질의 좁은 경계를 갖고 식별가능한 핵이 부족한 치밀한 핵을 가진 작고 성숙한 림프구의 존재, 및/또는 비정

형 세포 및/또는 절단된 세포 및/또는 전립프구의 존재를 포함한다.

- [0302] 암이 세포의 DNA에서의 돌연변이 결과로서, 세포 사멸을 피하거나, 제어할 수 없이 증식하는 세포를 초래할 수 있다는 점은 익히 공지되어 있다. 따라서, 이들 돌연변이를 검사하는 것(또한 세포유전학적 검사로도 공지됨)은 암의 진단 및/또는 예후를 평가하는데 유용한 도구가 될 수 있다. 이것의 예는 만성 림프구 백혈병의 특징인 염색체 위치 13q14.1의 결실이다. 세포에서 돌연변이를 검사하기 위한 기술, 예를 들어, 형광 원위치 혼성화(FISH)는 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0303] “세포유전학적 검사”에, 세포, 특히 염색체에서의 DNA의 검사가 포함된다. 세포유전학적 검사는 불응성 암 및/또는 재발된 암의 존재와 연관될 수 있는 DNA에서의 변화를 확인하는데 사용될 수 있다. 이는 하기를 포함한다: 염색체 13의 장완에서 결실 및/또는 염색체 위치 13q14.1의 결실 및/또는 염색체 12의 세염색체증(trisomy), 및/또는 염색체 12의 장완에서의 결실, 및/또는 염색체 11의 장완에서의 결실, 및/또는 11q의 결실 및/또는 염색체 6의 장완에서의 결실 및/또는 6q의 결실, 및/또는 염색체 17의 단완에서의 결실 및/또는 17p의 결실, 및/또는 t(11:14) 전위, 및/또는 (q13;q32) 전위, 및/또는 항원 유전자 수용체 재배열, 및/또는 BCL2 재배열, 및/또는 BCL6 재배열, 및/또는 t(14:18) 전위, 및/또는 t(11:14) 전위, 및/또는 (q13;q32) 전위, 및/또는 (3:v) 전위, 및/또는 (8:14) 전위, 및/또는 (8:v) 전위, 및/또는 t(11:14) 및 (q13;q32) 전위.
- [0304] 암이 있는 대상체는, 종종 신체에의 암의 부담 결과인 특정한 신체적 증상을 보인다. 이들 증상은 종종 동일한 암에서 재발하고, 따라서 질병의 진단 및/또는 예후 및/또는 진행의 특징일 수 있다. 의학 전문가가 어떤 신체적 증상이 어떤 암과 연관이 있는지, 및 이들 신체적 증상을 어떻게 평가하는 것이 질병의 진단 및/또는 예후 및/또는 진행과 상관 관계에 있을 수 있는지 이해할 것이다. “신체적 증상”에, 간비대 및/또는 비장 비대가 포함된다.
- [0305] “차가운” 종양을 갖는 환자는 통상적인 면역 체크포인트 차단 요법(예를 들어, 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체의 투여)에 반응할 가능성이 낮다. 따라서, 일부 구현예에서, 차가운 종양을 갖는 환자는 면역 체크포인트 차단 요법에 내성이 있다.
- [0306] 이러한 관찰에 비추어 볼 때, ICB에 대한 내성은 상당한 미충족 의료 요구를 구성하며 내성을 극복하는 데 도움이 될 수 있는 약물은 큰 치료 가능성을 가지고 있다. 따라서, 본 발명의 장점은 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1항체를 PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적인 항체와 조합하여 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스가 상기 내성을 극복할 수 있는 시너지 효과를 내고, 기존에 면역 체크포인트 억제제를 사용하여 치료가 불가능했던 차가운 종양을 표적으로 한다는 것이다.
- [0307] 본 발명은 또한 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 제1 항체 분자 및 PD-1 및/또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항체 분자 발현할 수 있는 종양용해 바이러스와 조합, 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 보조제와 조합을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다. 이러한 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 및 보조제는 당업계에 공지되어 있다.
- [0308] 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 바이러스, 세포 및/또는 약학적 조성물은 항산화제 및/또는 완충제 및/또는 정균제, 및/또는 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수용성 및/또는 비수용성 멸균 주사 용액; 및/또는 현탁화제 및/또는 증점제를 포함할 수 있는 수성 및/또는 비수성 멸균 현탁액을 포함하는 비경구 투여에 적합할 수 있다. 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 세포 및/또는 약학적 조성물은 단위 용량 또는 다회 용량 용기, 예를 들어 밀봉 앰플 및 바이알에 존재할 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 냉동 건조(동결건조) 조건에서 저장될 수 있다.
- [0309] 증식의 주입 용액 및 현탁액은 멸균 분말 및/또는 과립 및/또는 전술한 종류의 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0310] 인간 환자에 대한 비경구 투여의 경우, 항-PD-L1 항체 분자의 1일 투여량 수준은 일반적으로 1mg/kg 환자 체중 내지 20mg/kg일 것이거나, 또는 일부 경우에는 단일 투여 또는 분할 투여로 심지어 100mg/kg까지 투여될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 용량은 10mg/kg이다. 더 낮은 용량이 특별한 상황에서, 예를 들면 장기간 투여와 병용될 때 이용될 수 있다. 어떤 경우에서도 의사는 개별 환자에게 가장 적합할 실제 투여량을 결정할 것이며, 이것은 특정 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 가변적일 것이다. 상기 투여량은 평균 경우의 예시이다. 물론, 더 높거나 더 낮은 투여량 범위가 장점이 되는 개별 사례가 존재할 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0311] 전형적으로, 항체 분자를 포함하는 본원에 기재된 약학적 조성물(또는 약제)은 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체

분자를 대략 2mg/ml 내지 150mg/ml 또는 대략 2mg/ml 내지 200mg/ml의 농도로 함유할 것이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체 분자를 10mg/ml 또는 25mg/ml의 농도로 함유할 것이다.

[0312] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체가 펩트올리주맙인 경우, 항체는 대략 25mg/ml의 용량으로 사용된다. 일부 다른 구현예에서, 펩트올리주맙은 3주마다 200mg(iv)의 용량으로 또는 6주마다 400mg(iv)의 용량으로 사용된다.

[0313] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체가 니볼루맙인 경우, 항체는 대략 10mg/ml의 용량으로 사용된다. 일부 구현예에서, 니볼루맙은 2주마다 240mg(iv)의 용량으로 또는 4주마다 240mg(iv)의 용량으로 사용된다. 일부 구현예에서, 니볼루맙은 항-CTLA-4 항체 이필리무맙과 조합하여 사용될 수 있으며, 이 경우 니볼루맙은 3주마다 1mg/kg의 용량으로 최대 4회 용량 또는 2주 또는 3주마다 3mg/kg의 용량으로 사용된다.

[0314] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체가 아테졸리주맙인 경우, 항체는 대략 60mg/ml의 용량으로 사용된다. 일부 다른 구현예에서, 아테졸리주맙은 2주마다 840mg(iv)의 용량으로 또는 3주마다 1200mg(iv)의 용량으로 또는 4주마다 1680mg(iv)의 용량으로 사용된다.

[0315] 당업자는 본원에 기재된 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체 중 임의의 것이 그의 처방 정보에 기재된 임의의 용량 또는 투여 요법으로 사용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0316] 전형적으로, 약학적 조성물(또는 약제)은 바이러스 및 정량 기술에 따라서 본원에 기재된 종양용해성 바이러스를 대략 10^3 to 10^{12} vp(바이러스 입자), iu(감염성 단위) 또는 pfu(플라크-형성 단위)로 함유할 것이다. 샘플에 존재하는 pfu의 양은 허용 세포(예를 들어, CEF 또는 Vero 세포)의 감염 후 플라크의 수를 계산하여 플라크 형성 단위(pfu) 역가를 얻고, 260nm 흡광도를 측정하여 vp의 양을 얻고, 예를 들어, 항-바이러스 항체를 사용하여 정량적 면역형광에 의해서 iu의 양을 얻음으로써 결정될 수 있다. 일반적인 가이드로서, 종양용해성 수두 바이러스를 포함하는 약학적 조성물에 적합한 개별 용량은 대략 10^3 내지 대략 10^{10} pfu, 이롭게는 대략 10^3 pfu 내지 대략 10^9 pfu, 바람직하게는 대략 10^4 pfu 내지 대략 10^7 pfu; 보다 바람직하게는 대략 10^6 pfu 내지 대략 10^7 pfu이다.

[0317] 일부 구현예에서, 대상체가 마우스인 경우, 종양용해성 바이러스의 최적 용량은 대략 10^6 pfu 내지 10^7 pfu이다. 일부 구현예에서, 대상체가 인간인 경우, 종양용해성 바이러스의 최적 용량은 대략 10^6 pfu 대략 10^9 pfu이다.

[0318] 일반적으로, 인간에서, 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 바이러스, 세포 및/또는 약학적 조성물의 경구 또는 비경구 투여가 바람직한 경로이며, 이는 가장 편리하다. 수의학적 사용을 위해서, 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 바이러스, 세포 및/또는 약학적 조성물은 일반적인 수의학적 실시예에 따라서 적합하게 허용 가능한 제형으로서 투여되고, 수의사는 특정 동물에 가장 적절한 투여 요법 및 투여 경로를 결정할 것이다. 따라서, 본 발명은 (상기 기재되고 추가로 하기에 기재된 바와 같이) 다양한 병태를 치료하는데 유효한 양의 본 발명의 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열 플라스미드, 바이러스 및/또는 세포를 포함하는 약학적 제형을 제공한다.

[0319] 바람직하게는, 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 바이러스, 세포 및/또는 약제학적 조성물은 정맥내; 종양내; 근육내; 피하를 포함하는 군으로부터 선택된 경로에 의해서 전달되도록 개작된다. 투여는 단일 주사 또는 여러 번의 반복 주사의 형태일 수 있다(예를 들어 동일하거나 상이한 투여량, 동일하거나 상이한 경로, 동일하거나 상이한 투여 부위에서). 대략 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 또는 10^{10} pfu의 종양용해성 수두 바이러스(예를 들어, 본원에 기재된 TK 및 RR-결합 백시니아 바이러스)가 종양내 투여에 특히 적합하다.

[0320] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 결합 모이어티의 약학적으로 허용 가능한 산 또는 염기 부가염을 포함하는 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 바이러스, 세포 및/또는 약학적 조성물을 포함한다. 본 발명에서 유용한 상술된 염기 화합물의 약학적으로 허용가능한 산 부가염을 제조하는데 사용된 산은 무독성 산 부가염, 즉 약리학적으로 허용가능한 음이온을 함유하는 염, 예컨대 그중에서도 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 니트레이트, 술페이트, 바이술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 아세테이트, 락테이트, 시트레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 바이타르트레이트, 숙시네이트, 말레에이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 사카레이트, 벤조에이트, 메탄술포네이트, 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포

포네이트 및 파모에이트 [즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-히드록시-3 나프토에이트)]염을 형성하는 것이다. 약학적으로 허용되는 염기 부가염이 또한 본 발명에 따른 작용제의 약학적으로 허용되는 염 형태를 생성하는데 사용될 수도 있다. 본질적으로 산성인 본 작용제의 약학적으로 허용되는 염기 염을 제조하는데 시약으로서 사용될 수 있는 화학 염기는 이러한 화합물과 무독성 염기 염을 형성하는 것이다. 이러한 무독성 염기 염은 이에 제한되는 것은 아니나, 특히 이러한 약학적으로 허용되는 양이온, 예컨대 알칼리 금속 양이온(예를 들어, 포타슘 및 소듐) 및 알칼리토금속 양이온(예를 들어, 칼슘 및 마그네슘)으로부터 유래된 것, 암모늄 또는 수용성 아민 부가염, 예컨대, N-메틸글루카민-(메글루민), 및 저급 알칸올암모늄 및 약학적으로 허용되는 유기 아민의 다른 염기 염을 포함한다. 본원에 기재된 항체 분자, 뉴클레오타이드 서열, 플라스미드, 바이러스 및/또는 세포는 저장을 위해 동결건조될 수 있고, 이용 전에 적합한 담체에 재구성될 수 있다. 임의의 적합한 동결건조 방법(예를 들어, 분무 건조, 케이크 건조) 및/또는 재구성 기술을 이용할 수 있다. 동결건조 및 재구성은 다양한 정도의 항체 활성 손실(예를 들어, 통상적인 면역글로불린, IgM 항체는 IgG 항체보다 더 큰 활성 손실을 갖는 경향이 있음)을 야기할 수 있다는 점 및 이용 수준이 보상하기 위해 상향 조절되어야 할 수 있음을 당업자는 인식할 것이다. 일 구현예에서, 동결건조된(냉동 건조된) 폴리펩티드 결합 모이어티는 재수화될 때 이것의 활성(동결건조 이전)의 약 20% 이하, 또는 약 25% 이하, 또는 약 30% 이하, 또는 약 35% 이하, 또는 약 40% 이하, 또는 약 45% 이하, 또는 약 50% 이하를 손실시킨다.

[0321] 일부 구현예에서, 바이러스 조성물은 생리학적 또는 약 염기성 pH(예를 들어, 대략 pH 7 내지 대략 pH 9, 특별하게 바람직하게는 pH는 7 내지 8.5, 더욱 특별하게는 8에 가까운 pH를 포함함)에서 적절하게 완충된다. 적절한 삼투압을 보장하기 위해 바이러스 조성물에 1가 염을 포함시키는 것이 또한 유익할 수 있다. 상기 1가 염은 특히 NaCl 및 KCl로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 상기 1가 염은 바람직하게는 10mM 내지 500mM(예를 들어, 50mM) 농도의 NaCl이다. 적합한 바이러스 조성물은 사카로스 50g/L, NaCl 50mM, Tris-HCl 10mM 및 소듐 글루타메이트 10mM, pH8을 포함한다. 조성물은 또한 저온 저장 온도에서 종양용해성 바이러스를 보호하기 위한 동결보호제를 포함하도록 제형화될 수 있다. 적합한 동결보호제는 비제한적으로 수크로스(또는 사카로스), 트레할로스, 말토스, 락토스, 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을, 바람직하게는 0.5% 내지 20% 농도(중량 g/부피 L, w/v로 지칭)로, 그리고 고분자량 중합체, 예컨대, 텍스트란 및 폴리비닐피롤리돈(PVP)을 포함한다

[0322] 본원에 기재된 바와 같은 제1 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스를 포함하는 조성물 및 제2 항체 분자를 포함하는 조성물은 단일 조성물로서 같은 시간에(즉, 동시에) 투여될 수 있음을 인지할 수 있다.

[0323] 대안적으로, 이들 조성물은 유사한 시간에 또는 상이한 시점(예를 들어, 하루 또는 일주일 간격으로)에서 별도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 종양용해성 바이러스는 제2 항체 분자 전에 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 제2 항체 분자는 종양용해성 바이러스 전에 투여될 수 있다. 이러한 순차적 투여는 종양용해성 바이러스와 제2 항체 분자의 시간적 분리에 의해 달성될 수 있다. 대안적으로, 또는 제1 옵션과 조합하여, 순차적 투여는 항-CTLA-4 항체를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스를 투여함으로써, 종양내와 같이 이것이 암에 도달하도록 하고, 이어서 전신적으로 투여되어 종양용해성 바이러스 이후 암에 도달하도록 함으로써, 종양용해성 바이러스와 제2 항체 분자의 공간적 분리에 의해 달성될 수도 있다.

[0324] 본 발명의 종양용해성 바이러스 및 제2 항체 분자는 상기 기재된 바와 같이 각각의 성분의 확립된 치료 요법에 따라 투여될 수 있다. 이는 각각의 성분의 투여가 서로에 대해 동시에 또는 상이한 시간에 있을 수 있음을 의미한다.

[0325] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 제1 항체 분자와 제2 항체 분자를 발현할 수 있는 종양용해성 바이러스의 투여를 반복할 수 있다. 예를 들어, 투여는 치료 효과가 존재하는 데 필요한 바와 같이 2회, 3회, 4회, 5회, 또는 다회 반복될 수 있다.

[0326] 본 발명의 소정의 구현예를 구현하는 바람직한 비-제한적인 실시예가 하기 도면 및 실시예를 참조하여 이제 기술될 것이다:

도면의 간단한 설명

[0327] **도 1: 신규한 Treg-고갈 αCTLA-4 mAb의 생화학적 및 기능적 특성화.** (A) 항체 매개 생존 및(B) CT26 종양-보유 BALB/c 마우스에서의 TIL 조절. 종양이 확립된 동물은 Treg-관련 특이성 또는 대조군 mIgG2a 항체(n=5~15)를 나타내는 항체를 4회 주사(10mg/kg) 받았다. (C) CTLA-4 특이적 mAb는 시험관내-활성화된 CD4⁺ T 세포의 ADCC를 유도함. 용해된 표적 T 세포를 FACS에 의해 확인하였다. 그림은 스튜던트 t-검정(Student's t-test)에 의해 평균 ± SD(n=4~8) **p<0.01을 나타낸다. (D) 항-CTLA-4(IgG1) mAb는 생체내 huPBMC 마우스

에서 Treg 고갈을 매개함. 클론 4-E03은 이필리무맙과 비교하여 인간 Treg 세포(상부 패널)의 고갈이 향상되었지만 $CD8^+$ T 세포(하부 패널)는 그렇지 않음을 나타낸다. 각각의 점은 하나의 마우스를 나타낸다. 그래프는 2개의 실험으로부터의 평균 데이터를 나타낸다. 일원 ANOVA에 의한 * $p < 0.05$. (E) ELISA에 의한 인간, 마우스 및 사이노몰거스(cynomolgus) CTLA-4 및 CD28에 결합하는 4-E03 hIgG1 및 이필리무맙. (F) 시험관내-활성화된 CTLA-4 발현 인간 T 세포에 결합하는 4-E03 IgG1를 rhCTLA-4-Fc 단백질(검정색 선)으로 사전 차단하였다 (G) ELISA에 의한 CTLA-4에 결합하는 4-E03 및 2-C06 블록 CD80 및 CD86. (H) 시험관내 기능성 리간드 차단. 그래프는 시험관내 활성화된 인간 PBMC를 α CTLA-4로 처리한 후 상층액에서 IL-2를 나타낸다. 대표적인 공여체가 나타나 있다($n=6$). (I) 유세포분석에 의한 마우스 CTLA-4 mAb의 용량 의존적 결합과 α mCTLA-4-형질주입된 세포. (J) ELISA에 의한 재조합 CTLA-4에 결합하는 항-CTLA-4 mAb 블록 B7 리간드(CD80 및 CD86). (K) Treg 고갈 활성 및 $CD8^+$ T 세포/Treg 비($n=4\sim8$) 및 (L) CT26 종양 보유 BALB/c 마우스에서 α 마우스 CTLA-4 항체에 의해 유도된 생존.

도 2: Treg-고갈 α CTLA-4 및 GM-CSF를 발현하는 종양용해성 백시니아 바이러스의 생성 및 특성화. (A) α CTLA4 항체 및 GM-CSF의 중쇄(J2R 유전자좌에서) 및 경쇄(I4L 유전자좌에서)를 인코딩하는 데 사용되는 백시니아 바이러스 벡터의 개략도 (B) LoVo 세포에서의 복제 동역학 및 (C) $VV_{GM}-\alpha$ hCTLA4(BT-001)의 MIA PaCa-2 세포에 대한 세포용해성 활성. 대조군으로 TG6002(재조합 J2R 및 I4L 결손 백시니아 바이러스)를 첨가하였다. (D) MIA PaCa-2 BT-001- 감염된 세포 배양물로부터 정제된 4-E03의 쿠마시 블루 염색 후 전기영동 프로파일. 레인 2 및 5: 재조합 4-E03; 레인 1 및 4: MIA PaCa-2 BT-001- 감염된 세포의 배양 배지로부터 정제된 4-E03. 레인 1 및 2: 비환원 조건; 레인 3 및 4: 환원 조건. (E) $VV_{GM}-\alpha$ hCTLA4(BT-001)에 의해 감염 48시간 후 표시된 인간 종양 세포의 4-E03 및 인간 GM-CSF의 발현 수준. (F) TF-1 증식 검정에 의해 결정된 E)에서 생성된 GM-CSF의 생물학적 활성. 재조합 인간 GM-CSF(유럽 약전 기준 표준에서 얻은 몰그라모스티모(Molgramostim))가 양성 대조군으로 포함되었다. (G 및 H) BT-001에 감염된 MIA PaCa-2 세포에서 생성된 4-E03의 기능성 평가 (G) 시험관내: 그림 1E와 같이 고정화된 재조합 hCTLA 단백질에 결합함으로써 (H) 생체내: (Treg 고갈) 도 1d에서와 같이.

도 3: 종양내 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4는 생체내 종양-제한된 CTLA-4 수용체 포화 및 Treg 고갈과 관련된 항-종양 활성을 가지고 있다. (A) CT26 종양-보유 마우스는 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4(7.5×10^6 , 7.5×10^5 또는 7.5×10^4 pfu), $VV-\alpha$ CTLA4(7.5×10^6 pfu) 또는 앰티(empty) 대조군 $VV(7.5 \times 10^6$ pfu)($n=20$ 마우스/그룹)로 치료되었다. (B) 10^7 pfu에서 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4를 3회 근육내 주사한 후(0, 2, 및 4일) 또는 α CTLA-4 mAb 5-B07 3mg/kg($n=3$ 마우스/시간 시점)을 복강내 주사한 후 CT26 종양-보유 마우스의 종양 및 혈청에서 α CTLA-4의 약동학. 회색으로 표시된 영역은 CTLA-4 수용체 포화도의 EC_{10} 내지 EC_{90} 범위를 나타낸다(도 1j 참조). (C) $FoxP3^+$ 세포의 수는 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4 주입 후 10일째에 종양 및 비장에서 FACS에 의해 분석되었다. 그래프는 3개의 독립적인 실험($n=13$ 마우스/군)으로부터의 풀링된 데이터를 나타낸다.

도 4: 종양내 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4는 염증 및 차가운 종양 미세환경에 걸친 합성 종양 모델에서 광범위한 항-종양 활성을 가지고 있다. (A) CT26, A20 또는 EMT6 종양을 보유한 BALB/c 마우스 또는 MC38 또는 B16 종양을 보유한 C57BL/6 마우스는 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4 또는 α mCTLA-4 mAb가 걸여된 대조군 바이러스(VV 앰티 또는 VV_{GM})를 3회 반복 주사했다. 종양 세포 주입 후 4일 또는 ~50 내지 100 mm³의 부피를 가질 때 치료를 시작하였다(B16만 해당). 그래프는 개별 마우스 및 대응하는 생존체의 종양 성장을 나타낸다($n=10$). (B) CT26 종양 세포는 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4를 갖는 우측 측면 종양에서 BALB/c 마우스의 우측 및 좌측 측면에 이식되었다. 근육내 주사(세로 점선, A에서와 동일)는 종양이 ~100 mm³의 부피에 도달했을 때 시작되었다($n=9\sim10$).

도 5: 종양내 $VV_{GM}-\alpha$ CTLA4는 강력한 전신 $CD8^+$ T 세포 의존성 항-종양 면역을 유도한다. (A) BALB/c 마우스를 CT26 종양 세포에 대한 s.c. 켈린지 전후에 $CD8$ (짧은 대시 라인) 또는 $CD4$ (긴 대시 라인) 고갈 항체로 처리하였다. 종양의 부피가 ~20 내지 50 mm³에 도달하면 도 4a와 같은 치료가 시작된다. 1군당 10마리의 마우스로(2개 중) 하나의 대표적인 실험을 나타낸다. (B~D) CT26 종양-보유 마우스를 는 VV 로 근육내 처리되거나 α CTLA-4 mAb(3mg/kg의 클론 5-B07)로 복강내 처리되었다. 종양 세포 현탁액 및 비장세포는 $VV-$ 또는 CT26 (AH-1)-특이적 펩티드로 생체외에서 재자극되었으며 $IFN-\gamma^+$ 및 $TNF-\alpha^+$ $CD8^+$ T 세포 또는 MHC 그룹 I-표지된 다량체 양성 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 FACS에 의해 정량화되었다. (B) AH-1 펩티드 양성(상부 패널) 또는 사이토카인

양성(하부 패널) 비장세포의 유세포분석 점 도표를 나타낸다. 표시된 장기에서 (C) 항원 특이적 및 (D) IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ CD8⁺ T 세포의 정량. 각각의 점은 하나의 마우스를 나타낸다. 일원 ANOVA에 의한 (n= 3~6 실험) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, ****p < 0.001.

도 6: 종양내 유도된 CD8⁺ T 세포 항-종양 면역은 Fc γ R 의존적이고 cDC1 의존적이다. (A) CT26 종양-보유 WT 및 *Fc γ R1^{-/-}* BALB/c 마우스는 도 4a와 같이 VV_{GM}- α CTLA4 또는 PBS를 근육내 주사하였다. 그래프는 종양 부피(좌측 및 가운데 패널) 및 마우스 생존(우측 패널)을 나타낸다. 세로선은 치료의 종료를 나타낸다. (n=10 마우스/군) (B) VV_{GM}- α CTLA4 대 VV 엔터 종양으로 처리된 CT26 종양에서 상향 또는 하향 조절된 352개의 차등 발현 유전자 세트가 풍부한 GO 용어. 최저 조정된 p-값을 갖는 20개의 풍부한 용어가 나타나 있다. (C) 도 6b로부터의 5개의 가장 풍부한 GO 용어와 관련된 차등 발현 유전자의 네트워크도. 이들 5개의 풍부화된 GO 용어와 관련된 유전자만 확인되었다. (D) MC38 종양-보유 WT 및 *Batf3^{-/-}* BALB/c 마우스는 도 4a 및 도 6a와 같이 VV_{GM}- α CTLA4 또는 PBS를 근육내 주사하였다. 그래프는 종양 부피(좌측 및 가운데 패널) 및 마우스 생존(우측 패널)을 나타낸다. 세로선은 치료의 종료를 나타낸다. (n= 8 내지 10마리 마우스/군).

도 7: 종양내 VV_{GM}- α CTLA4는 말초 이펙터 CD8⁺ T 세포를 확장시키고 Treg 및 소진된 CD8⁺ T 세포를 감소시킨다. CT26 "쌍둥이" 종양을 포함하는 BALB/c 마우스를 근육내 VV_{GM}- α CTLA4 또는 PBS로 (오른쪽 옆구리 종양만) 처리하였다. 치료 후 10일째에 비장, 주입 및 대측 종양을 수집하고 T 세포 집단을 식별하도록 설계된 고차원 패널로 염색했다. (A) 근육내 VV_{GM}- α CTLA4는 활성화된 CD4⁺ Treg 세포(FoxP3⁺ Klr γ 1⁺, "T1")를 감소시키고, 소진된 CD8⁺ T 세포(PD1⁺ TIM3⁺, "T2")를 감소시키고, 주입 및 비주입 종양(상부 패널)의 활성화된 이펙터 CD8⁺ T 세포를 확장시키고, 그리고 비장(S1, 하부 패널)의 활성화된 CD8⁺ T 세포(Klr γ 1⁺, "T3")를 확장시켰다. (B) A에 도시된 데이터의 정량화를 나타낸다. 5마리의 마우스/군을 사용한 (3개 중) 하나의 대표적인 실험이 나타난다. (C) 유세포분석 플롯은 선택된 근육내 T 세포 클러스터의 특징적인 마커를 나타낸다.

도 8: 종양내 VV_{GM}- α CTLA4는 α PD-1과 상승작용하여 "차가운" ICB 내성 종양을 거부한다. (A 및 B) 2개의 B16 종양, 하나의 큰 종양(5x10⁵ 세포, 치료된 종양) 및 하나의 작은 종양(1x10⁵ 세포, 대측)을 운반하는 C57BL/6 마우스는 VV_{GM}- α CTLA4(세로 점선)를 3회 근육내 주사받고 α PD-1(29F.1A12, 10mg/kg; 3주 동안 주 2회, 회색 영역)을 3회 복강내 주사받았다. (A) 생존(n= 10~20), 로그순위법에 의해 *p < 0.05 (B) 종양내 주사 및 대측 종양의 종양 성장 곡선. (C) A20 종양-보유 BALB/c 마우스에 3회 VV_{GM}- α CTLA4를 근육내 (1x10⁵ pfu의 차선의 용량), α PD-1을 복강내 (RMP 1~14, 10mg/kg의 전체 용량) 또는 종양이 ~135 mm²의 부피에 도달할 때 둘 모두의 조합을 처리한다. 그래프는 동물 생존율(n=10)을 나타낸다.

도 9: CTLA4-특이적 mAb의 특성화. (A) 갓 절제된 난소 종양, 복수 및 혈액의 샘플을 건강한 PBMC와 비교하였다. CTLA-4 발현은 유세포분석을 통해 CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Treg 세포, CD4⁺ 비-Treg 세포 및 CD8⁺ 이펙터 T 세포에서 평가되었으며 PBMC 전달 2주 후 NOG 비장에서 추출된 인간 T 세포에서의 발현과 비교되었다. 데이터는 건강한 PBMC의 경우 n = 11, 복수의 경우 n = 20, 종양의 경우 n = 9, 환자 혈액의 경우 n = 5인 개별 환자/공여자를 나타낸다. (B) 인간 PBMC를 정맥내로 NOG 마우스에게 주사하였다. 이식 후 2-3주째에, 비장을 절개하고, 세포 현탁액을 10mg/kg 4-E03 hIgG1, 4-E03 hIgG1 N297Q 또는 아이소타입 대조군으로 처리한 후에 SCID 수용자에 복강내 주사하였다. 세포를 복강내 세척에 의해 수집하고, 처리 후 24시간에 정량화하였다. % 세포 고갈을 아이소타입 대조군으로 정규화하였다. 각각의 점은 하나의 마우스를 나타낸다. (C) 가용성 인간 CTLA-4에 대한 4-E03 및 이필리무맙의 결합 동역학은 Biacore 분석에 의해 평가되었다. mAb는 고정화된 항-인간 Fc에 의해 칩 상에서 포획되었고, 각각의 주기마다 상이한 농도의 CTLA-4 단백질이 주입되었다. 4-E03 및 이필리무맙에 대한 K_D 값은 각각 0.6nM 및 2.7nM이었다. (D) 유세포분석에 의해 인간 T 세포를 내인성으로 발현하는 CTLA-4에 대한 항-CTLA-4 mAb의 용량 의존적 결합. (E) 적정된 용량의 마우스 대리 항체 5-B07 mIgG2a(10 μ g/ml, 3배 희석 단계 포함)의 결합을 ELISA에 의해 마우스 CTLA-4 및 CD28에 대해 시험하였다. (F) 1x10⁶ CT26

세포가 BALB/c 마우스(n=7)에 피하 주사되었다. 종양이 대략 100 mm^3 의 크기에 도달했을 때, 마우스는 0일, 4일 및 7일에 $200 \mu\text{g}$ (10mg/kg)의 5-B07 mIgG2a, 5-B07 mIgG1 N297A 또는 아이소타입 대조군 항체를 받았다. 8일째에, 종양을 취하고 FACS에 의해 TIL을 분석하였다. 나타난 데이터는 그룹당 n=7 마우스를 대상으로 한 대표적인 실험의 평균값(+SD)이다.

도 10: 종양 및 혈액에서 바이러스 및 이식유전자의 약동학. (A 및 B) 도 3b에 기재된 종양 샘플을 또한 사용하여, (A) 무린 GM-CSF 및 (B) 바이러스 부하 C-E) LoVo 이종이식된 종양의 약동학의 종양내 농도를 측정하였다. LoVo 세포를 Swiss 누드 마우스의 우측 옆구리에 이식하였다. 종양 부피가 약 120 mm^3 (D0으로 정의됨)에 도달했을 때, 마우스를 10^5 pfu 의 $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-hCTLA4}$ (BT-001) 또는 VV를 근육내 또는 3mg/kg의 4-E03 단일 클론 항체를 복강내 단일 주사하여 치료했다. 표시된 각 시점에서 3마리 마우스의 혈액 및 종양을 수집했다. (C) 4-E03, (D) GM-CSF 및 (E) 바이러스의 농도는 각각 ELISA 및 Vero 세포에서의 적정에 의해 결정되었다. 선은 각각의 시점의 값의 중앙값을 연결한다.

도 11: 근육내로 처리. $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 는 치료된 그리고 비치료된 종양에서 오래 지속되는 항-종양 반응을 유도한다. (A) CT26 종양 세포를 BALB/c 마우스의 우측 및 좌측 옆구리에 이식하였다. $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 로 우측 옆구리 종양에 근육내 주사(x3, 이틀 간격)는 종양이 $\sim 100 \text{ mm}^3$ 의 부피에 도달했을 때 시작된다. 처리된 바이러스 농도 및 대측 종양을 처리 후 1일째 평가하였다. (그룹당 n=3 마우스; 마우스 1-3(M1-3); N.D. = 검출되지 않음) B-C) CT26 종양-보유 마우스를 A)에서와 같이 표시된 용량의 $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 로 처리하였다. 대안적으로, 10^7 또는 10^5 pfu 의 $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 를 정맥내로 제공하였다. 개별 종양 성장 곡선 (B) 및 생존 곡선(C)이 나타난다. (D) 제 시도된 종양 성장의 억제. CT26 종양 세포를 BALB/c 마우스에 피하로 주사하였다. $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 로 근육내 처리 또는 엠티 대조군 VV는 A)에서와 같이 예정되었다. 도 4b의 도 범례에 나타난 바와 같이, 생존 마우스는 마지막 VV 주사 후 100일째에 CT26 또는 Renca 세포로 재challenge되었다.

도 12: 종양내 유도된 CD8 T 세포 면역은 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -의존적이다. WT 및 $\text{Fcer1g}^{-/-}$ BALB/c 마우스를 1×10^6 CT26 세포로 피하로 challenge하였다. 종양이 대략 100 mm^3 에 도달했을 때, 마우스는 0일, 2일 및 5일에 $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 또는 PBS 대조군을 3회 반복 주사받았다(10^7 pfu 최종 투여량). 8일째에, 종양 및 비장을 분리하고 FACS에 의해 $\text{FoxP3}^+ \text{CD4}^+$ 세포를 분석하였다.

도 13: 근육내로 처리. $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 는 CD8^+ T 세포에 의존적이다. (A) 1×10^6 CT26 세포로 피하로 마우스에 challenge하기 3일 전에 10마리의 BALB/c 마우스의 그룹은 1mg의 CD8- 또는 CD4- 고갈 항체(또는 상응하는 아이소타입 대조군 항체)로 처리되거나 처리되지 않았다. 또다른 4일 후에(치료 시작 대비 -3일째), $200 \mu\text{g}$ 의 고갈 항체를 복강내 투여하였다. 이어서, 마우스를 0일, 2일 및 4일에 $1 \times 10^7 \text{ fu}$ 에서 $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 로 복강내 처리하였다. 인도적 종료시점(humane end-point)에 대한 생존 백분율이 나타난다. 데이터는 2개의 독립적인 실험을 대표한다. (B) CT26 종양-보유 마우스를 VV로 근육내 또는 항-CTLA-4 mAb(3mg/kg의 클론 5-B07)로 복강내 처리하였다. 종양 세포 현탁액을 VV- 또는 CT26 (AH-1) -특이적 펩티드로 생체외에서 재자극하고, 4시간 동안 배양하고 $\text{IFN-}\gamma^+$ 및 $\text{TNF-}\alpha^+$ CD8^+ T 세포의 수를 유세포분석으로 정량화하였다. 각각의 점은 하나의 마우스를 나타낸다. 일원 ANOVA에 의한 대표 실험(n= 3~6) **p < 0.01, ***p < 0.005, ****p < 0.001. (C) 및 (D) 비감독 클러스터링에 의해 식별된 (C)12개의 종양내 (D) 10개의 비장 CD3^+ 하위집단의 중앙값 마커 발현을 표시하는 히트맵.

도 14: B16 종양은 항-CTLA-4 + 항-PD-1에 의한 전신 치료에 불응성이다. B16 종양-보유 C57BL/6 마우스는 4일, 7일, 11일에 10mg/kg의 항PD-1 또는 항PD-1과 항CTLA-4(10mg/kg)의 조합으로 복강내 처리되었다 (A) 데이터는 표시된 대로 세포 접종 후의 날에 종양 부피(mm^3)로 표시된다; 각각의 선은 개별 마우스를 나타낸다. (B) 하루 패널은 표시된 처리 후에 B16 보유 마우스의 인도적 종료시점에 대한 생존 백분율을 나타낸다. (C) B16 종양-보유 C57BL/6 마우스는 도 8에 기재된 바와 같이 3회 $\text{VV}_{\text{GM}}\text{-}\alpha\text{CTLA4}$ 로 근육내 주사 및/또는 항-PD-1로 복강내 주사를 받았다. 마지막 치료 6일 후, 종양을 수집하고 종양 침윤 T 세포의 수를 유세포분석에 의해 분석하였다. 각각의 점은 하나의 마우스를 나타낸다. (n=3 실험).. 일원 ANOVA에 의한 *p < 0.05. 고도로 T

세포 염증성 CT26 종양 미세환경에서 T 세포 침윤의 수준이 참조(세포 접종 후 20일째에 CT26 종양에서 결정됨)로 나타나 있다.

실시예

재료 및 방법

세포주

인간 배아 신장 세포주 293T, 무린 흑색종 B16-F10, 무린 대장암종 CT26, 무린 B세포 림프종 A20, 무린 유선 EMT6, 무린 루이스 폐암종 세포주(LL/2)는 ACC(American Type Culture Collection)에서 구입했으며 크라운바이오(Crown Bio)로부터 인간 CTLA-4(293T-CTLA4)로 안정적으로 형질주입된 세포를 확보했다. 세포를 10% FCS, 10mM의 HEPES 및 1mM의 피루브산 나트륨이 보충된 RPMI+ glutamax(CT26) 또는 DMEM+ glutamax(MC38, B16-F10)에서 배양하였다. EMT6 세포를 15% FCS, 10mM의 HEPES 및 1mM의 피루브산 나트륨이 보충된 Waymouth 배지에서 유지하였다. GFP(ATCC로부터 구입)와 함께 hFcγRIIIA-158V를 발현하는 NK-92 세포주를 보충된 α-MEM 배지에서 배양하였다(문헌[Binyamin et al., 2008]). 1차 세포는 R10 배지(2mM의 글루타민, 1mM의 피루브산, 100IU/ml의 페니실린 및 스트렙토마이신 및 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640; Life Technologies의 GIBCO)에서 배양되었다. 인간 대장 선암 세포주 Lovo(ATCC), 췌장 종양 세포주 MIA PaCa-2(ATCC) 및 인간 위암 세포주 Hs-746 T(ATCC)는 10% FBS가 보충되고 40mg/L의 겐타마이신이 함유된 DMEM(Gibco)에서 성장하였다. 인간 난소 종양 세포주 SK-OV-3(ATCC)와 인간 대장암 세포주 HCT 116(ATCC)은 10% FBS가 보충되고 40mg/L의 겐타마이신이 함유된 Mc Coy의 5A 배지(ATCC)에서 성장하였다. 인간 적혈구 세포주 TF-1(ATCC)은 10% FBS가 보충되고 40mg/L의 겐타마이신 + 2ng/mL의 GM-CSF가 포함된 RPMI 1640(Sigma)에서 성장하였다.

마우스

마우스는 국소 병원체-무함유 시설에서 유지되었다. 모든 실험에 대해, 어린 성인 마우스는 성- 및 연령-매칭되었고 실험군으로 무작위로 할당되었다. 모든 절차는 실험 동물에 대한 현지 윤리 위원회에 의해 승인되었으며(Malmö/Lunds djurförsöksetiska nämnd); BioInvent에서 허가 번호 17196/2018 또는 2934/2020; 또는 Transgene APAFIS Nr21622 프로젝트2019072414343465에서 승인되었으며 현지 윤리 지침에 따라 수행되었다. C57BL/6 및 BALB/c 마우스를 Taconic, Janvier 또는 Charles River로부터 입수하였다. 사용된 유전자 변형 균주는 다음과 같다: Taconic에서 구매한 C.129P2(B6)-*Fcer1gtm1Rav* (*Fcer1g*-KO on BALB/c background and BALB/cAnNTac WT controls); B6.129S(C)-*Batf3tm1Kmm/J*(문헌[Hildner et al., 2008]); Jackson Laboratories에서 구매한 *Batf3*-KO on C57BL/6J background and C57BL/6J WT controls).

인간(임상) 샘플 및 윤리

윤리적 승인은 Skåne University Hospital의 윤리위원회에서 얻었다. 헬싱키 선언에 따라 사전 동의가 제공되었다. 환자 샘플은 스웨덴 Lund에 있는 Skånes University Hospital의 산부인과 및 종양학과를 통해 얻었다. 복수액을 단리된 단일 세포 현탁액으로 평가하였다.

인간 조직의 처리

수술을 받는 환자로부터 얻은 난소 종양 샘플을 작은 조각으로 절단하고, DNase I(Sigma) 및 Liberase TM(Roche Diagnostics)과 R10에서 37°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 남아있는 조직을 기계적으로 분해하고, 세포 현탁액과 함께 70 μm 세포 스트레이너에 통과시켰다. 매칭된 말초 혈액 샘플을 수득하고, 20분 동안 800 x g에서 Leucosep 튜브(Greiner)를 통해 원심분리하여 Ficoll-Paque PLUS(Cytiva)를 사용하여 말초 혈액 단핵 세포를 분리하였다. Halmstad(스웨덴) 병원의 혈액 센터에서 인간 버피 코트(human buffy coat)를 수득하고 표준 프로토콜에 따라 처리했다.

항체 의존적 세포 세포독성

ADCC 검정은 GFP와 함께 CD16-158V 대립유전자를 발현하도록 안정적으로 형질주입된 NK-92 세포주를 사용하여 수행되었다. CD4⁺ T 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 건강한 기증자의 말초 혈액에서 CD4⁺ 표적 T 세포를 단리하였다. 세포를 37°C에서 CD3/CD28 dynabeads(Life Technologies, Thermo Fisher)로 72시간 동안 자극하여 CTLA-4 및 50ng/ml 재조합 hIL-2(R&D Systems)를 상향조절하였다. 표적 세포를 NK 세포와 혼합하기 전에 4°C에서 30분 동안 10 μg/ml의 mAb와 함께 사전 인큐베이션하였다. 세포를 이펙터:표적 세포 비율

2:1로 4시간 동안 배양하였다. 유세포분석에 의해서 용해를 결정하였다. 간단히 말해서, 인큐베이션 이후에, 세포 현탁액을 4°C의 암실에서 Fixable Viability Dye eFluor780(eBioscience)과 함께 VioGreen-접합된 항-CD4(M-T466, Miltenyi Biotec)로 염색한 다음 FACS로 세포를 분석하였다.

시험관내에서 기능성 블록

SEB PBMC 검정을 위해, 건강한 공여자의 총 PBMC를 96웰 플레이트(1×10^5 개 세포/웰)에 시딩하고, 20 내지 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 적정 용량의 항-CTLA-4 IgG의 존재 하에서 1 $\mu\text{g/ml}$ 포도상구균 장독소 B(SEB, Sigma Aldrich)로 자극하였다. 3일 후, 상층액을 채집하고 제조사의 지침에 따라 MSD(Meso Scale Discovery, Rockville, USA)에 의해 IL-2를 정량화하였다.

시험관내 결합 검정

형질주입된 세포를 발현하는 CTLA-4는 APC-표지된 염소 항-인간 2차 항체(Jackson ImmunoResearch)로 세척 및 염색하기 전에 표지된 항-CTLA-4 mAb 농도와 함께 4°C에서 20분 동안 인큐베이션되었다. 앰티 벡터(미도시)로 형질주입된 세포에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

1차 세포에 대한 IgG 결합은 시험관내-활성화된 분리된 CD4^+ T 세포에서 분석되었다. 간단히 말해서, 인간 말초 CD4^+ T-세포를 MACS CD4^+ T-세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 음성 선택에 의해 총 PBMC로부터 정제하였다. CD4^+ T 세포는 CTLA-4 발현을 상향조절하기 위해 3일 동안 R10 배지에서 CD3/CD28 dynabeads(Life Technologies)와 50ng/ml 재조합 hIL-2(R&D Systems)로 시험관 내에서 활성화되었다. 시험관내-활성화된 인간 CD4^+ T 세포를 항-CD4와 함께 표지된 농도의 항-CTLA-4 mAb와 함께 인큐베이션하였다. 결합된 항-CTLA-4 mAb를 APC-표지된 염소-항-인간 IgG로 검출하였다. 경쟁적 결합 검정에서, 2 $\mu\text{g/ml}$ Alexa 647-표지된 항-CTLA-4 mAb를 CTLA-4 발현 세포와 인큐베이션하기 전에 재조합 인간 또는 사이노몰거스 CTLA-4-Fc 단백질(50 $\mu\text{g/ml}$; R&D Systems)과 혼합하였다. 결합된 IgG 결합을 FACS에 의해 검출하였다.

VV 생성 및 정제

재조합 바이러스는 J2R 및 I4L 유전자좌에서 GFP 또는 mCherry를 인코딩하는 시작 모체 코펜하겐 백시니아 바이러스와 2개의 전달 플라스미드를 사용하여 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 2개의 연속적인 상동 재조합에 의해 생성되었다. 전달 플라스미드는 p7.5 프로모터 하에 있고 J2R 재조합 암이 측면에 있는 mAb의 중쇄 또는 p7.5 프로모터 하에 있고 I4L 재조합 암이 측면에 있는 류린 또는 인간 GM-CSF의 경쇄를 추가로 인코딩하거나 인코딩하지 않는다(도 2a 참조). 재조합 바이러스를 비-형광 플라크의 증폭/단리 과정을 여러 번 반복하여 단리하였다. 이어서, 재조합 바이러스를 CEF에서 생성하고, 세포 용해 후 5 μm 여과에 의해 정제한 다음, 0.2 μm 접선 유동 여과를 사용하여 정제/농축하였다. 마지막으로, 바이러스를 사카로스 50g/L, NaCl 50mM, Tris 10mM, 글루탐산 나트륨 10mM, pH 8로 다이아필트레이션(diafiltration)에 의해 체형화하고, 분취하고, 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

이 공보에 사용된 모든 바이러스는 TK-RR-코펜하겐 균주로부터 유래하였다:

VV: 무완 백시니아 바이러스 또는 TG6002(FCU1 키메라 효소, 벤치마크 재조합 VV를 인코딩하는 백시니아 바이러스)

VV_{GM}: 류린 GM-CSF를 인코딩하는 백시니아 바이러스

VV_{GM}- α CTLA4: 류린 GM-CSF 및 5-B07(항-마우스 CTLA-4, 마우스 IgG2a)을 인코딩하는 백시니아 바이러스

VV- α CTLA4: 5-B07을 인코딩하는 백시니아 바이러스

VV_{GM}- α hCTLA4(BT-001): 인간 GM-CSF 및 4-E03(항-인간 CTLA-4, 인간 IgG1)을 인코딩하는 백시니아 바이러스.

바이러스 복제, 시험관내에서 종양용해성 활성 및 이식유전자 발현

BT-001의 복제는 10^{-3} (즉, 1000개 세포에 대한 1개 바이러스)의 감염 다중도(MOI)에서 BT-001로 Lovo 세포의 감염 후 24시간, 48시간 및 72시간에서 총 바이러스 역가를 측정하여 평가되었다. Vero 세포에 대한 플라크 분석에 의해 바이러스 역가를 결정하였다.

도 범례에 나타난 MOI에서 MIA PaCa-2 세포를 BT-001과 함께 5일 동안 인큐베이션한 후 세포 계수기(Vi-Cell)를 사용하여 세포 생존율을 정량화하여 BT-001의 종양용해성 활성을 평가하였다. BT-001의 복제 및 종양용해성 활성 모두는 현재 임상 평가 중인 코펜하겐 TK- RR- 백시니아 바이러스 TG6002의 것으로 벤치마킹되었다(문헌 [Foloppe et al., 2019]).

이식유전자 발현은 여러 인간 종양 세포주인 LoVo, HCT 116(대장암), MIA PaCa-2(췌장암), SK-OV3(난소암) 및 Hs176T(위암)에 의해 감염된 후 평가되었다. 배양 상층액을 감염 후 48시간에 수집하고 원심분리하고 ELISA에 의한 4-E03 및 hGM-CSF 농도의 사전 측정에서 0.2 μm에서 여과하였다.

항체 정제

~4.7 10⁷ MIA PaCa-2 세포/플라스크를 포함하는 15개의 F175 플라스크를 소 혈청이 없는 DMEM에서 BT-001로 MOI 0.01에 감염시켰다. 감염 후 72시간 후 세포 상층액을 채집하고, 폴링하고, 원심분리하고, EDTA(2mM 최종) 및 Tris pH 7.5(20mM 최종)를 첨가하기 전에 0.2 μm에서 여과하였다. 폴 상층액을 4℃에서 PBS에서 미리 평형화된 1mL protA Hitrap 컬럼(GE healthcare, 참조 17-5079-01)에 로딩했다. 결합된 항체를 100mM 글리신 HCl에 의해 pH 2.8로 용리하고 PBS에 대해 투석하였다. 정제된 4-E03을 환원 또는 비-환원 조건 하에서 SDS-PAGE(NuPage Bis-Tris 겔 4~12% Thermo NP0323)에 로딩하고, 겔을 InstantBlue(Expediton, iSB1L) 쿠마시 블루로 염색하였다. 이러한 정제된 항체(즉, 4-E03 MIA PaCa-2)를 CTLA-4 결합 및 생체내 Treg 고갈 활성에 대해 추가로 평가하였다.

효소-결합 면역흡착 검정

GM-CSF. 인간 및 무린 GM-CSF 농도를 Quantikine®ELISA GM-CSF 면역검정(R&D Systems)을 사용하여 결정하였다.

인간 GM-CSF 작용기를 TF-1 증식 검정을 사용하여 평가하였다. 알려진 농도의 hGM-CSF(표준 또는 BT-001에 감염된 세포)가 있는 경우 TF-1 세포의 세포 증식은 생존 세포의 탈수소효소에 의한 MTS의 포르마잔으로의 효소적 전환(490nm에서의 흡광도로 측정)을 사용하여 비색법으로 측정되었다. 490nm에서의 흡광도를 GM-CSF의 농도에 대해 플롯팅하고, 곡선을 재조합 GM-CSF(즉, 몰그라모스팀)로 수득한 것과 비교하였다.

CTLA4/CD28 단백질에 대한 결합. 항체 결합 ELISA의 경우, 정제된 인간 CTLA4-Fc, 인간 CD28-Fc(R&D Systems) 및 마우스 CTLA4-Fc(Sino Biologicals)를 1pmol/웰에 검정 플레이트로 코팅하는 반면 마우스 CD28-His(R&D Systems)는 5pmol/웰에 코팅하였다. 상이한 항체를 10 μg/ml로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 결합하도록 두었다. 결합된 n-CoDeR® mIgG2A 또는 hIgG1 항체를 항-마우스/항-인간 H+L-HRP(Jackson ImmunoResearch) 또는 항-마우스/인간 람다 경쇄 항체 HRP(Bethyl)를 사용하여 검출하였다. 발색(TMB T0440) 또는 발광 기질(Pierce 37070)을 사용하고, Tecan Ultra로 플레이트 판독을 수행하였다.

CD80/CD86 상호작용 차단. 리간드 차단 ELISA의 경우, 정제된 인간 CTLA4-Fc(R&D Systems)를 2pmol/웰(CD80용) 또는 1pmol/웰(CD86용)로 분석 플레이트에 코팅하였다. 항체를 0.4pM 내지 67nM 범위의 농도로 첨가하고 1시간 동안 결합하도록 두었다. His-태그된 리간드를 각각 200nM 및 100nM에서 첨가하였고(rhCD80 및 rhCD86; R&D Systems) 이는 ELISA에 의해 파일렛 실험에서 최적화된 바와 같다(데이터 미도시). 플레이트를 15분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 세척 후, 결합된 리간드를 HRP-표지된 항-His 항체(R&D Systems)로 검출하였다. Super Signal ELISA Pico(Thermo Scientific)를 기질로 사용하고, Tecan Ultra Microplate 판독기를 사용하여 플레이트를 분석하였다. 대안적으로, 마우스 CTLA4-Fc(Sino Biological)를 1pmol/웰로 분석 플레이트에 코팅하였다. 항체를 10 μg/ml(67nM)의 출발 농도로 첨가하고, 2배 희석 단계를 사용하여, 1시간 동안 결합하도록 두었다. His-태그된 리간드, CD80 및 CD86(Sino Biological)을 50nM에서 첨가하고, 플레이트를 30분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 검출 및 판독을 전술한 바와 같이 수행하였다.

마우스 실험

생체내 종양 실험. 배양된 종양 세포를 좌측 옆구리 또는 양쪽 옆구리에 피하 주사하였다(CT26 1x10⁶ 세포; MC38 5x10⁵ 세포; A20 5x10⁶ 세포; EMT6 1x10⁶ 세포; B16-F10 0.5-5x10⁵ 세포). 달리 명시되지 않는 한, 마우스에 10⁷ pfu의 VV_{GM}-αCTLA4 또는 대조군 VV를 격일로 3회 처리하였다. 종양 성장 실험을 위해 치료된 종양과 원격 종양의 종양 크기를 캘리퍼로 주 2회 측정하고 공식에 따라 종양 부피(mm³)를 계산하였다: (폭² x 길이 ×

0.52). 동물은 총 종양 부담(치료 및 대측 종양 결합)이 2000 mm³의 부피에 도달했을 때 안락사되었다(실험 종료). 기능적 실험을 위해, 조직을 수집하고, 도 범례에 표시된 시점에서 처리하였다. 마우스 종양을 DNase I(Sigma) 및 Liberise TM(Roche Diagnostics)을 사용하여 R10에서 37°C에서 15분 동안 분해하였다. 이어서, 세포를 70 µm 세포 여과기에 통과시키고, 검정에 직접 사용하였다. DC 표현형의 경우, 생존가능한 백혈구는 밀도 구배 원심분리(Cedarline Cat#CL5035)에 따라 풍부하였다.

1차 인간 이종이식 모델. PBMC-NOG/SCID 마우스는 200 µl PBS에서 Ficoll-Paque PLUS를 사용하여 분리된 1-2x10⁷ PBMC를 NOD 마우스(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/JicTac(Taconic))에 정맥 주사하여 생성되었다. 주사 후 대략 2주째, SCID 마우스(C.B-Igh-1b/IcrTac-Prkdcscid(Taconic))에 이어서 재구성된 NOG 마우스의 10x10⁶ 비장세포를 복강내 주사하였다. 1시간 후, 마우스를 10mg/kg의 mAb로 처리하였다. 마우스의 복강 내 유체는 24시간 후에 수집되었다. 인간 T 세포 하위세트를 식별하고, 하기 마커 CD45, CD4, CD8, CD25, CD127(모두 BD Biosciences) 마커를 사용하여 FACS에 의해 정량하였다.

종양 및 혈액에서 전이유전자 및 바이러스의 역동학 이전에 기재된 CT26 종양 모델에서, VV_{GM}-αCTLA4 또는 VV-αCTLA4를 상기에 언급된 바와 동일한 조건으로 투여하였다(즉, 0, 2, 4일차에 10⁷ pfu의 3회 근육내 주사). 3마리 마우스의 종양 및 혈액/시점은 1일, 4일(세 번째 주사 전), 8일 및 10일에 수집되었다. 바이러스의 농도는 Vero 세포에서 바이러스 적정에 의해 PBS에서 균질화된 전혈 및 종양에서 측정되었다. 5-B07 및 mGM-CSF 둘 모두의 농도를 혈청 및 종양 균질액에서 ELISA에 의해 측정하였다. 이종이식된 인간 종양 모델에서, LoVo 세포를 Swiss 누드 마우스의 좌측 옆구리에 피하 주사하였다. 약 2주 후 종양 부피가 ~120 mm³에 도달한 경우, 마우스를 무작위화하고 2개의 군으로 나누었다(15마리 마우스/군). 첫 번째 그룹은 10⁵ pfu의 VV_{GM}-αhCTLA4(BT-001)를 1회 근육내 주사하고 두 번째 그룹은 3mg/kg의 4-E03을 복강내 주사했다. 바이러스 주입 후 1일, 3일, 6일, 10일 및 20일에 3마리의 마우스의 종양 및 혈액/혈청을 수집했다. 4-E03 및 hGM-CSF 둘 모두의 바이러스 역가 및 농도를 이전 단락에 기재된 바와 같이 측정하였다.

항원-특이적 T 세포 반응

항원-특이적 T 세포 반응을 비장, 처리된 그리고 대측 종양에서 분석하였다. 간단히 말해서, 1 x 10⁶ 단리된 세포를 2 µg/ml의 종양(AH-1, SPSYVYHQF)- 또는 바이러스(S9L8, SPGAAGYDL)- 특이적 펩티드(BioNordika)로 재 자극하였다(문헌[Huang et al., 1996; Russell and Tschärke, 2014]). 종양 세포를 브레펠딘 A(Sigma)의 존재 하에 4시간 동안 펄스화하였다. 단리된 비장세포를 48시간 동안 재 자극하고, 마지막 4시간은 브레펠딘 A의 존재 하에 있었다. 그런 다음 CD45, TCR-β, CD8, TNF-α, IFN-γ 및 CD25에 대한 FACS 염색을 통해 사이토카인을 생성하는 CD8⁺ T 세포를 확인하였다. 동시에, 종양 및 바이러스-특이적 CD8⁺ T 세포는 MHC 클래스 I 멀티머(Pentamer H-2Ld - SPGAAGYDL-R-PE (S9L8) ProImmune, Pentamer H-2Ld - TPHPARIGL-R-PE (ctrl) ProImmune, Dextramer H-2Ld - SPSYVYHQF-APC (AH-1) Immudex, Dextramer H-2Ld - TPHPARIGL-APC (ctrl) Immudex)를 사용하여 식별되었다.

유세포분석

Fixable Viability Dye eFluor™ 780, Fixable Viability Stain 440UV 또는 프로피듐 아이오다이드를 사용하여 죽은 세포를 일상적으로 확인하였고, 이중선과 함께 분석으로부터 배제되었다. FoxP3 염색 완충액 세트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 세포내 염색을 수행하였다. 샘플 획득을 BD FACS Verse 또는 Fortessa II 상에서 수행하고, 데이터를 FlowJo 10.7.2를 사용하여 분석하였다. 종양내 및 비장 CD3⁺ T 세포의 UMAP를 생성하기 위해, 데이터를 FlowAI 도구(v.2.2)를 사용하여 세팅하고, 이어서 샘플을 처리 그룹 및 기관으로 바코딩하고 연결하였다. FlowJo 플러그인 UMAP(v3.1)는 기본 설정(거리 함수: 유클리드, 최근접 이웃: 15 및 최소 거리: 0.5)을 사용하고 모든 보상 매개변수 및 전방 산란(FSC) 및 측방 산란(SSC) 측정값을 포함하여 결과적인 유세포 분석 표준(FSC: flowcytometry standard) 파일에서 실행되었다. 클러스터 식별을 위해, FlowJo 플러그인 x-shift(v1.3)를 CD4, CD62L, CD25, ICOS, FoxP3, Klrp1, CD44, CTLA-4, PD-1, TIM-3, T-bet, GzmB, Ki-67과 같은 매개 변수를 포함하는 기본 설정(최근접 이웃 K = 82)을 사용하여 결과 UMAP에서 실행되었다. 전술한 파라미터에 대한 클러스터당 평균 발현을 FlowJo에서 얻은 스케일링된(scaled) 채널 값을 사용하여 계산하였다. 평균 발현 히트맵을 클러스터당 파라미터 평균으로 생성되었고 0과 1 사이에서 스케일링되었다.

항체

유세포 분석을 위한 단일클론항체: 항-인간 CD4-VioGreen (M-T466) Miltenyi Biotec Cat# 130-113-259, 항-인간 CD25-BV421 (클론 M-A251) BD Biosciences Cat# 562442, 항-인간 CD127-FITC (클론 HIL-7R-M21) BD Biosciences Cat# 561697, 항-인간 CD8-APC (클론 RPA-T8) BD Biosciences Cat# 555369, 항-인간 CTLA-4-PE (클론 BNI3) BD Biosciences Cat# 555853, mouse IgG2a, k isotype control -PE BD Biosciences Cat# 555574, 항-마우스 CD45.2-PerCP-Cy5.5 (클론 104) BD Biosciences Cat# 552950, 항-마우스 CD45.2-BUV737 (클론 104) BD Biosciences Cat# 612779, 항-마우스 CD25-BV421 (클론 7D4) BD Biosciences Cat# 564571, 항-마우스 CD8-BV786 (클론 53-6.7) BD Biosciences Cat# 563332, 항-마우스 CD4 -BV510 (클론 RM4-5) BD Biosciences Cat# 563106, 항-마우스 TCRb-Alexa Fluor 488 (클론 H57-597) BioLegend Cat# 109215, 항-마우스 PD-1-BB700 (클론 RMP1-30) BD Biosciences Cat# 748242, 항-마우스 CTLA-4-PECF594 (클론 UC10-4F10-11) BD Biosciences Cat# 564332, 항-마우스 CTLA-4-APC (클론 UC10-4B9) BioLegend Cat# 106310, 항-마우스 Klrg1-APC (클론 2F1) BD Biosciences Cat# 561620, 항-마우스 CD62L-BUV395 (클론 MEL-14) BD Biosciences Cat# 740218, 항-마우스 TIM3-PE (클론 5D12) BD Biosciences Cat# 566346, 항-마우스 ICOS-BV605 (클론 7E.17G9) BD Biosciences Cat# 745254, 항-마우스 CD44-APC-Cy7 (클론 IM7) BD Biosciences Cat# 560568, 항-마우스 Ki67-Alexa Fluor 700 (클론 B56) BD Biosciences Cat# 561277, 항-인간 Granzyme B- R718 (클론 GB11) BD Biosciences Cat# 566964, 항-마우스 Tbet-BV711 (클론 04-46) BD Biosciences Cat# 563320, 항-마우스 FoxP3-PeCy7 (클론 FJK-16s) Thermo Fisher Scientific Cat# 17-5773-82, 항-마우스 IFNg-PeCy7 (클론 XMGI.2) BioLegend Cat# 505826, 항-마우스 TNFa-Alexa Fluor 700 (클론 MP6-XT22) BD Biosciences Cat# 558000, Pentamer H-2Ld - SPGAAGYDL-R-PE (S9L8) ProImmune, Pentamer H-2Ld - TPHPARIGL-R-PE (ctrl) ProImmune, Dextramer H-2Ld - SPSYVYHQF-APC (AH-1) Immudex, Dextramer H-2Ld - TPHPARIGL-APC (ctrl) Immudex.

이차 항체: Goat 항-마우스 IgG (H+L) Peroxidase Jackson ImmunoResearch Cat# 115-035-003, 염소 항-인간 IgG (H+L) Peroxidase Jackson ImmunoResearch Cat# 109-035-003, 염소 항-인간 IgG, Fc-Fragment Specific-APC Jackson ImmunoResearch Cat# 109-136-098, 염소 항-인간 IgG-APC Jackson ImmunoResearch Cat# 109-136-088, 염소 항-인간 Kappa Light Chain HRP Bethyl Cat# A80-115P, Goat 항-마우스 Lambda Light Chain HRP Bethyl Cat# A90-121P, Goat 항-마우스 IgG-APC Jackson ImmunoResearch Cat# 115-136-146, 항-His MAb, (클론 AD1.1.10) R&D Systems Cat# MAB050, 항-His-HRP (클론 AD1.1.10) R&D Systems Cat# MAB050H.

생체내 실험에 사용된 상업적 항체: 항-마우스 CD8 (클론 53.6.72) BioXCell Cat# BP0004-1, 항-마우스 CD4 (클론 GK1.5) BioXCell Cat# BE0003-1, 항-마우스 PD1 (클론 29F.1A12) BioXCell Cat# BE0273, Anti-trinitrophenol rIgG2a isotype control (클론 2A3) BioXCell Cat# BE0089, 항-마우스 CTLA-4 (클론 9H10) BioXCell Cat# BE0131, 항-마우스 PD1 (클론 RMP1-14) BioXCell Cat# BE0146.

사내 생성된 항-마우스 및 항-인간 항체는 n-CoDeR 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리된다. 항-마우스 CTLA-4(클론 5-B07) 및 항-인간 CTLA-4(클론 4-E03)는 본원에 기재되어 있다.

RNA 서열

실험 절차 CT26 종양 세포를 그룹당 10마리의 BALB/c 마우스에 이식하였다. 이식 후 대략 1주일째 종양 부피가 20 내지 50 mm³에 도달했을 때(0일째로 정의됨), 마우스는 무완 백시니아 바이러스(VV 엠티) 또는 VV_{GM}-αCTLA4를 사용하여 D0 및 D2에 두 번, 50 μL에 근육내로 10⁷ pfu로 처리되지 않거나 처리되었다. D4에서 종양을 채취하고 Qiagen kit RNeasy Plus Mini Kit를 사용하여 RNA를 추출하였다. 샘플은 후속적으로 품질을 평가하는 날까지 -80°C에서 보존되었다. 정제된 RNA의 품질은 Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent 2100 Bioanalyzer System, 2100 Expert Software를 사용하여 평가되어 후속 3' mRNA 시퀀싱에 필요한 대로 RNA 단편의 최소 25%가 200nt(DV200 > 25%)보다 길도록 했다. 가닥 특이적 라이브러리를 준비하고 양쪽 끝을 IntegraGen(프랑스)에 의해 시퀀싱(쌍단 시퀀싱)하여 100nt 긴 읽기 쌍을 생성했다.

데이터 분석. 쌍형성된 판독물을 맞춤 생물정보학 파이프라인에 의해 처리하였다. 간단히 말해서, 포획된 RNA 단편의 3' 말단의 서열은 판독물 1로부터 추출된 반면, 고유한 분자 식별자(UMI) 서열은 판독물 2로부터 추출되었다. 품질 기반 트리밍 및 품질 관리 후, 판독물 2는 인공 엑스트라-염색체로서 *Mus musculus* 전체 유전체(mm10 어셈블리) + VV_{GM}-αCTLA4 게놈을 함유하는 맞춤형 게놈에 대해 STAR(문헌[Dobin et al., 2013])와 매핑되었다. 그런 다음 판독물은 UMI 도구 모음(문헌[Smith et al., 2017])에서 “독특한” 방법으로 추론된 프로그램을 사용하여 중복 제거되었다. 마지막으로, 중복 제거된 판독물을 HTSeq-카운트(문헌[Anders et

al., 2015])를 사용하여 정량화하였다. 그런 다음 샘플당 조회수(readcount) 데이터를 DESeq2를 사용하여 정규화하고(문헌[Love et al., 2014]), 두 조건 간의 배수 변화가 2 이상이고, 조정된 p-값이 0.1 미만이면 유전자를 차등적으로 발현하는 것으로 간주했다(다중 테스트의 경우 Benjamini-Hochberg 보정). 유전자 온톨로지(Gene Ontology, GO) 풍부화 분석은 R 패키지 clusterProfiler(문헌[Yu et al., 2012])로부터의 함수 enrichGO와 함께 상기 정의된 바와 같이 상향- 또는 하향-조정된 것으로 차등적으로 발현되는 유전자 세트를 사용하여 수행되었다.

중양 Treg-연관 수용체에 특이적인 Treg 고갈 항체의 단리

중양 Treg 세포 관련 수용체에 특이성이 있는 항체는 시험관내 CDR 서플링된 n-CoDeR® 항체 라이브러리를 중양-연관 Treg 세포(CT26, 4T1, B16 및 Lewis 폐 종양-보유 마우스로부터 단리됨) 대 CD4⁺ T 세포-고갈된 미분화 세포 및 본질적으로 앞서 기재한 바와 같은 종양-보유 마우스로부터의 CD11b⁺ 세포의 차등 생물학적 패닝에 적용하여 분리되었다(문헌[Veitonmaki et al., 2013]).

CTLA-4 mAb 생성

인간/마우스 CTLA-4에 대한 항체 단편을 n-CoDeR® scFv 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리하였다. 특정 CTLA-4 항체의 풍부화는 Streptavidin Dynabeads 또는 폴리스티렌 볼에 로딩된 비오티닐화된 h/mCTLA-4-His 단백질(Sino Biological)을 사용하여 3회 연속 패닝에 의해 달성되었다. 제3 선택 라운드는 또한 h/mCTLA-4의 세포 외 및 막횡단 영역 또는 관련 없는 비-표적 단백질을 인코딩하는 cDNA(Sino Biological)로 형질주입된 현탁 적응된 HEK293-EBNA 세포 과도를 포함한다. 사전 선택은 각각의 선택 전에 비오티닐화 비-표적 단백질로 발생하였다. 결합 파지는 트립신 소화에 의해 각 선택 라운드 후에 용리되었고 표준 절차를 사용하여 플레이트에서 증폭되었다. 선택 3의 파지미드는 scFv 생산 형식으로 변환되어 가용성(재조합 단백질) 및 세포 결합 항원(일시적 형질감염 세포)에 대한 특이적 결합을 평가하는 후속 스크리닝 검정에 사용되었다. 상업용 항체는 유세포 분석, 형광 마이크로어레이 기술(FMAT) 및 ELISA에 의해 재조합 및 세포 표면 결합 인간(Yervoy, Bristol Myers Squibb; 항-인간 APC, Jackson) 및 항-마우스 CTLA-4(BioLegend) CTLA-4의 평가에 사용되었다. 대응하는 아이소타입 대조군은 모든 실험에서 음성 대조군으로서 포함되었다. scFv의 일차 스크리닝을 위해, h/mCTLA-4 형질주입된 세포를 FMAT 플레이트에 시딩하였다. scFv를 발현한 대장균에 이어 탈글리코실화된 마우스 항-His 항체(R&D Systems) 및 항-마우스-APC(Jackson)를 첨가하였다. 염색된 세포를 8200 검출 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 검출하였다. 1차 스크리닝으로부터의 양성 클론을 재발현하고, 형질주입된 세포 및 재조합 단백질에 대한 결합에 대해 ELISA에서 재시험하였다. ELISA를 위해, scFv로 발현된 대장균을 h/mCTLA-4 또는 비-표적 단백질로 코팅된 플레이트에 첨가하였다. 결합된 scFv를 항-FLAG-AP(Sigma Aldrich), 이어서 기질 첨가(CDP-star, Life Technologies) 및 발광 판독(Tecan Ultra)을 사용하여 검출하였다.

총 42 및 31개의 고유 클론은 각각 hIgG1 및 mIgG2a 변이체로 전환되었다. VH 및 VL을 PCR 증폭시키고, 항체의 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 발현 벡터 내로 각각 삽입하고, 현탁 적응된 HEK 293EBNA 세포(ATCC)로 형질주입시켰다. 배양 배지를 형질주입 후 6일째에 수확하고, 표준 절차에 따라 ÄKTA Purifier 시스템에 연결된 MabSelect(GE Healthcare)로 패킹된 컬럼을 사용하여 항체를 정제하였다. 항체를 낮은 pH 완충액으로 용출한 다음, Spectra/Por Dialysis Membrane 4(Spectrum Laboratories Inc)를 사용하여 적절한 제형 완충액으로 투석하였다.

항체 순도는 CE-SDS(LabChip XII; Perkin Elmer, Massachusetts)와 SE-HPLC(Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific)에 의해 평가되었다. 모든 제제는 유럽 약전 2.6.14, 현재 버전에 맞게 조정된 발색 LAL-엔도크롬-K 키트(Charles River)를 사용하여 측정한 결과 내독소가 낮았다(<0.1 EU/mg 단백질): 박테리아 내독소, "방법 D. 발색 동역학 방법";

이어서, 정제된 IgG를 ELISA 및 Biacore 둘 모두에서, 형질주입된 HEK 세포뿐만 아니라 1차 세포 및 재조합 단백질에 결합하기 위해 평가하였다.

표면 플라즈몬 공명

재조합 단백질에 대한 결합을 또한, Biacore 3000을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술로 시험하였다. 항-인간 Fc(GE Healthcare)를 330nM의 농도를 갖는 포획 항체로서 CM5 센서 칩(GE Healthcare) 상에 고정시켰다. 재조합 단백질과 함께 4-E03 및 이필리무맙의 최적 농도를 예비 시험에서 평가하여 양호한 곡선 피팅을 얻고 물질 전달을 제한하였다. 항체(이 실험에서 5nM)를 10 µl/min로 1 분간 첨가한 후, 인간 CTLA-4 단백질(Sino

Biological)의 적정 농도(4-E03의 경우 1.6 내지 50nM, 이필리무맙의 경우 1.6 내지 200nM)를 30 μ l/min로 3분 동안 첨가하였다. 표면은 각 사이클 사이에 10mM의 글리신(pH 1.5)으로 재생되었다.

세포 형질주입

인간 및 마우스(Sino Biological) CTLA-4를 인코딩하는 cDNA를 리포펙타민 2000(Life Technologies)을 사용하여 현탁 적응된 293FT 세포(Life Technologies)로 형질주입하였다. 형질주입된 세포를 3737°C에서 5% CO₂, 120rpm으로 48시간 동안 FreeStyle™ 293 발현 배지(Life Technologies)에서 배양하였다. 유세포분석을 사용하여 표적 발현을 분석하였다.

데이터 가용성

본문에 보고된 RNAseq 데이터에 대한 할당된 기탁번호는 GEO: GSE176052이다.

정량화 및 통계 분석

모든 통계 분석을 GraphPad Prism 9.0(GraphPad Software Inc, La Jolla, CA)을 사용하여 수행하였다. 스튜던트 t-검정 또는 일원 ANOVA를 사용하여 p 값을 계산하였다. 인도적 종료시점에 대한 생존 기간을 로그순위법에 의한 유의성에 대한 분석으로 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법을 사용하여 플롯팅하였다. 유의성은 p<0.05일 때 인정되었다.

결과

Treg 고갈 항-CTLA-4 항체의 식별 및 특성화

면역 체크포인트 차단 및 항-CTLA-4 항체 요법은 임상적으로 검증된 접근법이지만, 항-CTLA-4 항체 효능에 기초한 메커니즘은 불완전하게 특성화된다. 자가항원에 대한 내성을 유지하는 동시에 효과적인 T 세포 매개 인식 및 외래 항원 발현 세포 및 종양 세포의 제거를 허용하는 CTLA-4의 중심 역할은 잘 확립되어 있다(문헌[Leach et al., 1996; Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995]). 축적된 데이터는 항-CTLA-4 항체가 T 세포가 종양 항원을 인식하고 종양을 거부하는 역치를 낮추는 작용을 하는 것 외에도 Fc γ R-발현 이펙터 세포와의 항체 상호작용 후 종양 내 Treg 세포의 고갈을 통해 치료 활성을 발휘할 수 있음을 시사한다(문헌[Peggs et al., 2009; Simpson et al., 2013]) (문헌[Ingram et al., 2018]). 이와 일치하여, 최근 데이터는 이필리무맙을 포함하는 항-CTLA-4 항체의 효능에서 Fc γ R 및 Treg 고갈에 대한 역할을 나타내었다(문헌[Arce Vargas et al., 2018]).

본 발명자들은 표적 불가지론적 F.I.R.S.T™ 발견 플랫폼(문헌[Veitonmaki et al., 2013])을 사용하여 T세포 염증 CT26 마우스 종양 모델에서 Treg 세포를 고갈시키고 생존을 향상시킬 수 있는 항체 및 그와 관련된 표적의 배열을 확인하였다(데이터 미도시, 도 1a 및 도 1b). CTLA-4 및 항-CTLA-4 항체는 이들 중에서 확인되었고, 항-CTLA-4 mIgG2a mAb는 종양내 Treg 세포를 고갈시키고 동종 CT26 종양을 갖는 동물의 치료 시 생존을 부여하였다(도 1a). 인간 CTLA-4-특이적 IgG1 항체의 초점 스크리닝은 인간 T 세포를 발현하는 CTLA-4의 유사한 시험관 내 고갈 활성을 갖는 여러 클론을 확인하였다(도 1c). 한 클론(4-E03)은 여러 기증자에 걸쳐 스크리닝했을 때 다른 클론에 비해 지속적으로 더 강한 CTLA-4⁺ T 세포 고갈 효능을 기반으로 두드러졌다(도 1c). 이 클론의 명백한 더 강한 고갈 활성의 생체 내 관련성을 조사하기 위해, 발명자들은 인간 PBMC가 NOD SCID IL-2R 감마-/- (NSG) 마우스에 이식되는 모델로 눈을 돌렸다. 이식편 대 숙주 유형의 상호작용 인간 Treg 및 CD8⁺ T 세포로 인해 강하게 활성화되고, 인간 종양에서 관찰된 것과 비교하여 유사한 공동자극성 및 공동 억제성 분자 발현을 나타낸다(도 9a). NOG-hPBMC CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 및 CD8⁺ T 세포의 분석에서는 실제로 9명의 난소암 환자로부터 얻은 T 세포에서 관찰된 것과 유사한 CTLA-4 발현 수준을 나타내었다(도 9a). 더욱이, 10mg/kg 이필리무맙 또는 추가의 항-CTLA-4 항체 클론(2-C06 및 2-F09)을 사용한 NOG-hPBMC 마우스의 투여는 인간 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 세포의 유사한 생체내 고갈 활성을 입증하였다(도 1d). 그러나, 4-E03은 인간 Treg 세포의 유익하게 더 큰 고갈을 유발했다. 중요하게는, 그리고 Treg 세포와 비교하여 종양 내 및 NOG-hPBMC CD8⁺ T 세포에서 CTLA-4의 낮은 발현과 일치하게, 4-E03은 인간 활성화 CD8⁺ T 세포의 고갈을 나타내지 않았다(도 1d). 생화학적 특성화, 특히 4-E03 항체 제제의 HPLC-SEC 분석에서는 >95% 단량체 IgG(데이터 미도시)를 보여 4-E03 강화 Treg 고갈이 항체의 응집으로 인한 것임을 배제했다. 본 발명자들 및 다른 관찰들과 일치하게, 항-CTLA-4 mAb Treg 고갈은 항체 Fc:Fc γ R 상호작용에 의존하는 것으로 나타났다. 4-E03(IgG1N297Q)의 Fc γ R-결합 손상

된 변이체는 WT Fc γ R-능숙(proficient) IgG1에 비해 심각하게 손상된 Treg 고갈을 나타낸다(도 9b).

이러한 발견은 4-E03이 CTLA-4 상의 기능적으로 별개의 에피토프에 결합함을 나타낸다. 따라서, 본 발명자들은 이필리무맙 및 다른 항-CTLA-4 항체에 대한 4-E03의 결합 및 리간드-차단 활성을 특징으로 한다. 모든 항체는 인간 CTLA-4의 세포의 도메인에 대해 높은 특이성을 보였고, ELISA에 의해 밀접하게 관련된 인간 상동체 CD28에 대한 관찰 가능한 결합은 없었다(도 1e). 4-E03 및 이필리무맙은 hCTLA-4에 대해 유사한 역가 및 효능으로 결합되어 있지만(도 1e 및 도 9c) 단지 4-E03만이 마우스 CTLA-4와의 약하지만 명확한 교차-반응성을 나타낸다(도 1e). 이러한 결과는 별개의 에피토프에 결합하는 2개의 항체와 일치한다.

시험관내 활성화된 인간 CD4⁺ T 세포에서 내인성 발현 CTLA-4에 대한 결합을 평가하는 4-E03 및 이필리무맙의 추가 비교 분석(도 9d 및 도 1f), B7의 차단:CTLA-4 상호작용(도 1g), 또는 B7의 억제:CTLA-4-매개 T 세포 억제(도 1h), 달리 동일한 효능 및 효과를 나타내었다. 결론적으로, 결과는 4-E03이 기능적으로 별개의 CTLA-4 에피토프에 결합함을 나타내었으며, 이는 더 강한 Treg 고갈과 연관되지만 B7:CTLA-4의 동등한 차단은 이필리무맙에 의해 표적화된 항원결정부에 대한 T 이펙터 세포 억제를 유도했다.

4-E03은 마우스 CTLA-4와 약하게 교차반응을 보였기 때문에(도 1e), 다음으로 본 발명자들은 면역능력이 있는 마우스 종양 모델에서 생체내 개념 증명 연구를 위한 적절한 대체를 확인하기 위한 스크리닝에 초점을 맞추었다. 마우스 CTLA-4 형질주입된 CHO 세포(도 1i) 및 마우스 CTLA-4 단백질(도 9e)에 대한 매우 특이적인 결합, B7:CTLA-4 상호작용의 차단(도 1j) 및 인간 환경에서 4-E03과 비교하여 종양내 마우스 Treg(도 11)의 유사한 강한 고갈을 나타내는 하나의 클론(5-B07)이 확인되었다. 또한, 항-mCTLA-4(5-B07)는 항종양 활성 및 CT26-종양 보유 BALB/c 마우스의 향상된 생존을 부여한다(도 11). 인간 세포에 대한 항-hCTLA-4(4-E03)에서 관찰된 바와 같이, 마우스 Treg의 항-mCTLA-4(5-B07) 고갈은 Fc:Fc γ R 상호작용에 의존하는 것으로 나타났다. Fc:Fc γ R-결합은 능숙하지만 Fc:Fc γ R-결합 손상된 변이체는 종양내 Treg를 고갈시켰다(도 9f).

CTLA-4에 대한 유사한 높은 특이성 및 CTLA-4:B7-패밀리 상호작용의 차단 활성과 함께 유사한 현저한 Treg-고갈 활성은 적절한 MoA-매치된 대체로서 항-hCTLA-4(4-E03) 및 항-mCTLA-4(5-B07)의 치료 가능성을 나타낸다.

종양-선택적 CTLA-4 차단 및 Treg 고갈을 위한 항체-인코딩 종양용해성 바이러스의 조작

항-CTLA-4 항체 요법의 빈번한 부작용은, T 세포 항상성 및 자가 내성을 유지하기 위해 종양 체크포인트로서 작용하는 CTLA-4의 잘 확립된 역할과 일치한다(문헌[Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995]). 그러나, Quezada 및 동료들의 최근 연구에 따르면 종양내 Treg 고갈은 이필리무맙 임상 활동에 크게 기여할 수 있으며(문헌[Arce Vargas et al., 2018]), 종양내 전달된 Treg 고갈 항체는 마우스 종양 모델에서 상당한 항종양 활동을 제공할 수 있다(문헌[Fransen et al., 2013; Marabelle et al., 2013b]). 중심 및 말초 구획에서 각각 작용하는 항-CTLA-4의 이러한 이중 활성은 항-CTLA-4 요법을 종양에 국소화하는 것이 항-CTLA-4 효능을 독성으로부터 분리하는 매력적인 전략일 수 있음을 시사한다.

본 발명자들은 Treg 고갈 항-CTLA-4를 발현하도록 조작된 종양내 전달 종양용해성 바이러스(OV)가 효과적면서도 안전한 종양-국소화된 항-CTLA-4 요법을 달성하기 위한 특히 매력적인 수단을 나타낼 것임을 가정하였다. 종양 세포의 감염 시 TME에서 CTLA-4 수용체의 국소 항체 생성 및 차단 및 Treg 고갈을 가능하게 하는 것 외에도, OV는 직접 및 간접 항종양 활성을 모두 발휘하는 것으로 생각되며 암 면역 요법에 승인되었다(문헌[Bommareddy et al., 2018]).

따라서, 본 발명자들은 글로벌 천연두 예방접종 프로그램에서 관찰된 임상적으로 입증된 안전성 및 강력한 면역 조절 효과를 갖는 약독화된 코펜하겐 균주(문헌[Foloppe et al., 2019])로부터 유래된 백시니아 바이러스 벡터를 조작하였고, 면역사막 및 면역 배제 암의 마우스 실험 모델에서 세포용해 및 염증성 세포 침윤 유도 특성을 나타내었으며(문헌[Fend et al., 2017; Kleinpeter et al., 2016; Liu et al., 2017; Marchand et al., 2018]), 전장 항-hCTLA-4 또는 항-mCTLA-4 IgG 항체 서열을 갖는다. 골수성 및 선천성 면역세포 주화성의 성장 인자 유도제 및 증진제인 GM-CSF(VV_{GM}- α CTLA4)(도 2a)를 추가로 인코딩하는 변이체 벡터도 생성하여 치료 효능을 평가하였다.

유전자 재구성 후에, 바이러스를 인코딩하는 재조합 항-CTLA-4가 감염되고, 복제되고(도 2b), 종양 세포주를 용해하는(도 2c) 것으로 확인되었다. 또한 조작된 종양 용해성 바이러스에 감염된 종양 세포주는 재조합으로 생산된 단백질에 비해 CTLA-4 수용체(도 2g)와 동등한 결합력을 가진 전장 IgG 항체 및 GM-CSF 전이유전자(도 2d 및 2e)를 생성하고 GM-CSF 의존성 TF-1 세포 증식(도 2f)을 지원하는 것으로 나타났다. BT-001에 감염된 MIA-

PaCa-2 종양 세포에 의해 생성된 4-E03은 또한 생체 내에서 인간 Treg 세포를 고갈시키는 것으로 나타났다(도 2h).

종양내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 는 종양-선택적 CTLA-4 수용체 포화 및 Treg 고갈과 관련된 항종양 활성을 갖는다

$VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 항종양 활성은 T 세포에 의해 고도로 침윤되고 전신 항CTLA-4 항체 치료에 민감한 것으로 알려진 CT26 BALB/c 모델에서 처음 평가되었다(문헌[Grosso and Jure-Kunkel, 2013]). CT26 종양-보유 동물에 대한 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 의 7.5×10^4 , 7.5×10^5 또는 7.5×10^6 pfu로 3개의 종양내 주사는 용량 의존적 항종양 효과를 나타내었고, 10^6 내지 10^7 pfu에서 정점을 찍었으며, 6 내지 7/10의 동물은 치료되었다(도 3a). 항 CTLA-4 항체 및/또는 GM-CSF 전이유전자가 결여된 대조군 바이러스를 사용한 치료는 항 CTLA-4 항체(0/10 마우스 생존)에 대한 절대적인 의존성과 치료 효능에 대한 GM-CSF의 한계 항 CTLA-4 강화 효과를 입증했다(7/10 대 5/10 마우스 생존). 확립된 용량-의존적, 항-CTLA-4-항체-의존적, 및 GM-CSF 향상 효과에 기초하여, 본 발명자들은 1×10^7 pfu의 종양내 전달 용량을 사용하여 이중 전이유전자-인코딩 OV($VV_{GM}-\alpha CTLA4$)에 대한 치료적 및 기계적 평가 및 특성화를 조사하였다.

본 발명자들은 다음으로, 전이유전자-인코딩 백시니아 OV의 종양내 투여 후 항-CTLA-4 (도 3b), GM-CSF(도 10a), 및 바이러스 입자(도 10b)의 종양 및 전신 농도를 평가하였다. 10^7 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 감염 입자를 합성 마우스 종양-보유 면역 능력이 있는 마우스에 종양내 주입하여 종양의 지속적인 포화와 관련된 종양내 항체 노출을 생성하였지만, 혈액, CTLA-4 발현 세포는 생성하지 않았다(도 3b 및 도 1i). 유사하게, 인간 종양 이종이식-보유 면역 결핍 마우스에 $VV_{GM}-\alpha hCTLA4$ 를 근육내 투여한 결과, 혈액과 비교하여 종양내 항체 농도가 수배 더 높았다(도 10c 내지 도 10e). 종양내 수용체 포화 농도를 달성했지만 전신 구획은 달성하지 못한 종양내 투여와 일치하게(도 3b), 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 는 종양 내 Treg 세포의 거의 완전한 고갈을 초래하였지만 CT26 종양-보유 BALB/c 마우스의 비장에서 Treg 수에는 영향을 미치지 않았다(도 3c).

종합적으로 결과는 항 CTLA-4를 인코딩하는 백시니아 바이러스의 종양내 투여가 종양 제한 CTLA-4 수용체 포화 및 생체내 Treg 고갈을 성공적으로 달성하여 종양-선택적 항 CTLA-4 치료 특성을 지원하고 다양한 암 실험 모델에서 생체내 효능 및 내약성 시험을 촉발한다는 것을 보여주었다.

$VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 는 광범위한 항종양 활성을 갖는다

본 발명자들은 상이한 유전적 마우스 배경(CT26 BALB/c 결장; EMT6 BALB/c 유방, MC38 C57BL/6 결장 및 B16 C57BL/6 흑색종, 도 4a)에 걸쳐 있는 다양한 면역 능력이 있는 마우스 암 모델에서 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 의 항종양 활성을 평가하기 위해 진행하였다. 모델은 항-CTLA-4 또는 항-PD-1을 사용하여 ICB에 민감하거나 내성을 포함하였다.

놀랍게도, 다양한 면역 염증 유형의 종양 미세 환경을 특징으로 하는 확립된 합성 종양을 운반하는 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 의 또는 BALB/c 마우스에 대한 근육내 투여는 동물의 대다수(A20= 10/10, EMT6= 8/10, MC38=8/10 및 CT26=10/10 생존 마우스)를 치료했다(도 4a). 마찬가지로, 면역 사막 유형의 TME와 항-PD-1 및 항-CTLA-4 모두에 대한 내성을 특징으로 하는 B16 C57BL/6 모델에서, 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 는 종양 성장을 유의하게 지연시켰고 3/10 동물을 치료하였다. 이러한 결과는 다양한 염증성 및 면역 배제 유형의 TME를 포함하여 다양한 암 유형에서 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 의 광범위한 치료 잠재력을 나타냈다.

$VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 에 의한 종양내 치료는 오래 지속되는 전신 항종양 면역을 유도한다

전임상 및 임상 연구는 종양-국소화된 암 면역요법의 치료 가능성을 입증하였다. 종양내 종양용해성 바이러스 요법은 단독으로(문헌[Andtbacka et al., 2015]) 또는 ICB와 조합하여(문헌[Chesney et al., 2018; Ribas et al., 2017]), 흑색종 암 환자에서 지속적인 반응을 유도한다. 기계적으로, 주입된 종양으로의 염증 세포 침윤을 유도하거나 향상시키기 위해 근육내 종양용해요법(oncovirotherapy)이 제안되어, 종양 항원 제시가 증가하고, 림프절로 이동하고, 프라이밍 후, 전신 항종양 “압스코팔(abscopal)” 효과를 발휘하기 위해 먼(주입되지 않은) 종양 병변으로 $CD8^+$ T 세포를 이동시킨다(문헌[Ngwa et al., 2018]). 임상에서, 암 환자는 전이, 검출 불가능 또는 주입할 수 없는 종양을 특징으로 하는 광범위한 질병을 나타낼 수 있기 때문에 이러

한 전신 적응 항종양 기억 반응의 유도는 중요할 것이다.

본 발명자들은 근육내 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 가 압스코팔 효과 및 전신 항종양 면역을 유도하는지 여부를 평가하기 위해 다중 갈래 접근법을 사용하였다. 먼저 종양세포를 각 동물의 오른쪽과 왼쪽 옆구리에 피하 이식하지만 한쪽 종양에만 난소를 주입하고 다른 한쪽 종양은 치료하지 않은 상태로 두는 '쌍둥이 종양 모델'을 이용하면, 주사하지 않은 종양에서 종양 성장이 감소한 것으로 압스코팔 효과를 평가하고 명시할 수 있다.

CT26 종양-보유 마우스에서 최대 효과적인 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 용량의 종양내 주입은 주입된 종양의 완전한 거부반응(9/9)과 주입되지 않은 종양의 거의 완전한 거부반응(7/9)을 초래하여 강력한 압스코팔 효과를 나타낸다(도 4b). 근육내 OV 투여의 진정한 압스코팔 특성은 2배로 확인되었다. 먼저, 주입에서 비주입 종양으로의 바이러스 입자 확산의 잠재적인 치료 효과를 배제하기 위해, 비주입 종양을 분석하여 바이러스 입자에 대해 음성임을 확인하였다(도 11a).

두번째로, 쌍둥이 종양 모델을 사용하여, 본 발명자들은 국소적(근육내) 또는 전신적(정맥내)으로 투여된 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 의 치료적으로 최대 유효한(10^7 pfu) 및 차선책(10^5 pfu) 용량의 항종양 활성을 비교하였다. 진정한 압스코팔 효과와 일치하는 근육내 투여는 시험된 두 용량 모두에서 복강내 투여에 비해 생존율이 향상되었다(도 11c). 실제로, 10^5 pfu의 근육내 투여량은 적어도 비주입 종양을 거부하는 100배 더 큰 복강내 주사된 용량과 비교하여 효과적이었다(도 11b 및 도 11c). 마지막으로, 적응 항원 특이적 면역 반응의 특징인 면역학적 기억을 유도하는 근육내 OV 투여와 일치하여, 회복된 동물은 동일한 재도전으로부터 보호되었지만(CT26), 관련이 없는(Renca) 종양은 보호되지 않았다(도 11d).

$VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 는 강력한 전신 $CD8^{+}$ T 세포 의존성 항종양 면역을 유도한다

본 발명자들은 $CD4^{+}$ T 세포 고갈 또는 $CD8^{+}$ T 세포 고갈 CT26 종양 보유 마우스와 비교하여 면역이 온전한 상태에서 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 치료 활성을 평가함으로써 전신 항종양 면역 반응의 특성을 조사하였다(도 5a 및 도 13a). 놀랍게도, $CD8^{+}$ T 세포 고갈은 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 항종양 활성을 완전히 제거했다. $CD4^{+}$ T 세포 고갈은 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 효과를 감소시켰지만 제거하지는 않았다. 이 데이터는 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 항종양 활성이 $CD8^{+}$ T 세포에 결정적으로 의존한다는 것을 보여주었다. 증명된 압스코팔 효과와 재도전에 대한 종양-특이적 보호와 함께, 결과는 종양내 전달된 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 가 강력한 전신 $CD8^{+}$ T 세포 항종양 면역을 유도했음을 강력하게 시사하였다.

따라서, 본 발명자들은 다음으로 근육내 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 가 종양 및 주변부에서 종양-특이적 및 바이러스 특이적 $CD8^{+}$ T 세포를 유도 또는 확장하는지 평가하였다. CT26 종양-보유 BALB/c 마우스는 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 로 종양내 치료를 받거나 임상적으로 이용가능한 항-CTLA-4 요법을 모방하기 위해 항-mCTLA-4 mAb 5-B07(3mg/kg)로 전신적인(복강내) 치료를 받았다. 종양 및 중심 구획(비장)의 CT26 종양 특이적 및 백시니아-특이적 $CD8^{+}$ T 세포는 두 가지 접근법으로 정량화되었다; CT26 종양 항원(AH-1)-특이적 및 백시니아 바이러스-특이적 다량체를 사용하여 채집된 비장에서 종양-특이적 $CD8^{+}$ T 세포의 직접 정량화 및 각각 CT26 유래 종양 펩티드 AH-1 및 백시니아 유래 펩티드 S9L8로 비장세포(도 5b) 또는 TIL의 생체의 자극 후 $IFN-\gamma^{+}$ $TNF-\alpha^{+}$ $CD8^{+}$ T 세포의 평가. GM-CSF만을 인코딩하는 PBS 또는 VV를 사용한 치료가 대조군으로 포함되었다. 예상대로, 그리고 강력한 전신 $CD8^{+}$ T 세포 의존성 항종양 면역을 유도하는 종양 내 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 와 일치하며, 근육내 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 는 비장세포 또는 텍스트레이머(dextramer) 염색의 생체의 자극에 의해 평가된 주입된 종양 및 말초(비주입 종양 및 비장) 구획 모두에서 종양-특이적 $CD8^{+}$ T 세포를 유도했다(도 5b 내지 도 5d 및 도 13b). 인상적으로, 근육내 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 는 전신 항-CTLA-4에 비해 종양 특이적 $CD8^{+}$ T 세포를 더 효과적으로 확장시켰다. $\alpha CTLA-4$ 가 결여된 PBS 또는 바이러스를 사용한 대조군 치료는 관독에 의해 종양 특이적 $CD8^{+}$ T 세포를 유도하지 않았다. 흥미롭게도, $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 를 사용한 근육내 처리는 비록 적은 수이지만 백시니아 특이적 $CD8^{+}$ T 세포도 유도했다.

종합적으로, 이러한 데이터는 종양내 $VV_{GM^{-}}\alpha CTLA4$ 가 강력한 전신 $CD8^{+}$ T 세포 의존성 항종양 면역을 유도한다는

것을 보여주었다.

종양내 유도 CD8⁺ T 세포 항종양 면역는 FcγR-의존적이고 Treg 고갈과 상관관계가 있다

방법위한 항종양 활성, 종양 및 주변부에서 종양 특이적 CD8⁺ T 세포의 강력한 확장 및 Treg 세포의 종양 제한 고갈은 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4로 매우 효과적이고 안전한 치료를 지원하였다.

항종양 면역의 기초가 되는 항체-매개 Treg 고갈에 대한 역할을 추가로 평가하고 확인하기 위해, 본 발명자들은 CT26 종양-보유 WT 및 일반적인 감마 사슬 결핍 (*FcγR1*^{-/-}) BALB/c 마우스에서 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4의 항종양 효과를 비교하였다. 기능적 활성화 Fc 감마 수용체 및 항-CTLA-4 항체가 부족한 *FcγR1*^{-/-} 마우스의 생체내 Treg 고갈 및 관련 항종양 활성은 이전에 FcγR-의존성을 활성화하는 것으로 나타났다(문헌[Arce Vargas et al., 2018; Simpson et al., 2013]). 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4 항종양 면역의 결정적인 기초가 되는 항-CTLA-4 유도 Treg 고갈과 일치하여, WT(10/10), 그러나 FcγR-결핍 동물(3/10)은 암으로부터 완전히 보호되고 치료되지 않았다(도 6a). FcγR-결핍 동물에서 관찰된 제한적이지만 유의미한 항종양 활성은 Treg 고갈(도 9f 및 12a)이 없는 경우 바이러스 벡터(도 4a) 및 CTLA-4:B7 차단 자체가 종양 성장을 지연시켰지만 제한된 생존 이점에만 기여했다는 발명자 및 다른 관찰과 일치했다.

항체로 코팅된 표적 세포의 면역 이펙터-매개 ADCC 및 ADCP를 제공하는 것 외에도 FcγR은 종양 항원 교차-제시를 촉진하고(문헌[DiLillo and Ravetch, 2015]), CD8⁺ T 세포 항종양 반응을 확장하고 향상시켜 정상적으로 배제된 MHCII 제한 세포의 종양 항원을 포괄하는 것으로 나타났다. 본 발명자의 발견은 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4 항종양 면역이 FcγR-의존적이고 종양-특이적 CD8⁺ T 세포 및 추가로 유도된 바이러스-특이적 CD8⁺ T 세포의 보다 강력한 확장을 유도하면 이것이 또한 종양 항원 교차-제시를 촉진할 수 있음을 나타낸다. 이 개념은 바이러스 벡터(VV)-주입 및 치료되지 않은 CT26 종양-보유 마우스와 비교하여 VV_{Gm}-αCTLA4-주입된 종양에서 채집된 종양의 차등 유전자 발현 분석에 의해 강화되었다(도 6b 및 도 6c). Batf 자체를 상향 조절하는 것 외에도, 차등 유전자 분석은 항원 교차-제시 cDC1 수지상 세포와 관련된 I형 IFN 반응 및 CD8α 마커의 상향조절을 보여주었다. 추가 시그니처는 VV_{Gm}-αCTLA4 항종양 면역의 유발 및 작동의 기초가 되는 상기 특성화된 CD8⁺ T 세포 의존적(및 잠재적으로 NK 세포-매개 그랜자임-의존적) 종양 세포용해를 지원했다.

VV_{Gm}-αCTLA4 유도 항종양 면역에서 항원 교차-제시에 대한 역할을 평가하기 위해, 본 발명자들은 전사 인자 *Batf3*가 결여된 마우스(*Batf3*^{-/-} 마우스)를 사용하였다. *Batf3*^{-/-} 마우스는 CD8α⁺ 수지상 세포가 부족하며, 결과적으로 결함이 있는 항원 교차-제시 및 감염 중 바이러스에 대한 CD8⁺ T 세포 반응 및 암의 마우스 실험 모델에서 종양 항원에 대한 심각한 손상을 나타낸다(문헌[Hildner et al., 2008]). 또한, cDC1s 및 항원 교차-제시는 αCTLA-4를 포함하는 면역 체크포인트 차단제의 치료 활성을 매개하는 것으로 알려져 있다(문헌[Gubin et al., 2014]). 따라서, 본 발명자들은 MC38 종양을 이식한 *Batf3*^{+/+} 및 *Batf3*^{-/-} C57BL/6 마우스에서 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4의 항종양 활성을 비교하였다. 놀랍게도, *Batf3*-결핍은 생존한 9/9 WT 마우스와 비교하여 0/8 *Batf3*^{-/-}에 의해 입증된 바와 같이 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4 항종양 면역을 폐기했다(도 6d).

종합적으로, 이러한 결과는 VV_{Gm}-αCTLA4가 FcγR-의존성 및 cDC1-의존성 항종양 활성을 모두 가지고 있음을 보여주었고, 종양내 유도된 Treg-결핍 및 종양 항원 교차-제시를 주요 메커니즘으로 확인했으며, 종양내 CTLA-4:B7-차단 및 종양 응고를 지원 메커니즘으로 확인하여 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4 유도 CD8⁺ T 세포 항종양 면역의 기초가 되었다.

종양내 항-CTLA-4-VV는 말초 이펙터 CD8⁺ T 세포를 확장시키고 Treg 및 고갈된 CD8⁺ T 세포를 감소시킨다

주입된 종양 및 측면 종양, 및 주변부에서 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4가 TIL 반응을 조절하는 방법을 정성적으로 특성화하였다. 다색 유세포분석과, 기능적으로 구별되는 항-종양 및 전-종양 TIL 하위세트를 식별하도록 설계된 고차원 항체 패널을 사용하여 치료군에 걸친 12개의 T 세포 클러스터를 확인하였다(도 7 및 도 13c). 놀랍게도, 근육내 VV_{Gm}-αCTLA4는 모의 처리된 동물과 비교하여 소진된 (PD-1⁺ TIM-3⁺) CD8⁺ T 세포 및 강력하게 확장된 비

-소진 Klr $g1^{+}$ 이펙터 CD8 $^{+}$ T 세포를 제거하였다(도 7). 동시에, 그리고 상기 발견과 일치하여, 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4는 높은 수준의 CTLA-4를 발현하고 특히 억제력이 있는 것으로 알려진 Klr $g1^{+}$ Tregs를 포함하여 CTLA-4+ 종양내 Treg를 효과적으로 고갈시켰다(문헌[Nakagawa et al., 2016])(도 7).

항체 인코딩 바이러스를 주입하지 않은 측면 원위 종양의 평가는 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4에 의한 TIL의 유사하지만 덜 심오한 변조를 보여주었다. 또한, α CTLA4-인코딩 종양용해성 바이러스의 종양내 투여가 주변부의 종양-특이적 CD8 $^{+}$ T 세포를 확장시킨다는 발명자의 관찰에 따라(도 5b 내지 5d), 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4가 비장에서 활성화된 그랜자임 B $^{+}$ (Klr $g1^{+}$) CD8 $^{+}$ T 세포 하위세트를 유도하였다(도 7a). 마지막으로, 항체-인코딩 바이러스가 종양-제한 Treg 고갈을 달성한 것과 일치하게, 종양층에서 고갈된 Treg 집단은 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4에 의해 비장에서 크게 변경되지 않았다(도 7a).

종양내 항-CTLA-4-VV는 항-PD-1과 결합하여 "차가운" 원위 종양을 거부한다

본 발명자의 관찰은 VV $_{Gf}$ - α CTLA4가 주로 항 CTLA-4 mAb-의존성 종양 항원 교차-제시 및 Treg-결핍을 포함하는 메커니즘에 의해 주입된 종양에서 국소적으로 작용하여 전신 적응성 항종양 면역 및 강력한 말초 종양 특이적 CD8 $^{+}$ T 세포 확장을 "연소"한다는 것을 보여주었다. 이러한 발견은 VV $_{Gf}$ - α CTLA4가 CD8 $^{+}$ T 세포를 종양으로 움직이는 데 도움이 되는 치료제와 상승작용할 수 있음을 나타낸다. 항PD-1은 주로 T 세포 소진의 역전에 의해 작용하고(문헌[Hui et al., 2017; Wei et al., 2018]), 그리고 아마도 줄기-유사 기억 CD8 $^{+}$ T 세포를 종양에 움직임으로써 작용할 것으로 생각된다(문헌[Galletti et al., 2020; Angell et al., 2020]). 상이한 기원의 다수의 고체 암에서 생존을 개선하는 항-PD-1 문서화된 능력에도 불구하고, 항-PD-1은 면역 침윤이 불량한 "차가운 종양"(문헌[Galon and Bruni, 2019])을 갖는 환자에서 결과를 개선하지 않으며, 이는 아마도 암 요법에서 가장 큰 충족되지 않은 의학적 요구를 나타낸다.

따라서 발명자들은 명백하게 다르고 잠재적으로 상호 보완적인 작용 메커니즘에 기초하여, 다음으로 B16 C57BL/6을 모델 시스템으로 사용하여 ICB-내성, 면역 침윤 불량 및 면역원성이 낮은 "차가운" 암에 초점을 맞춘 항-PD-1 및 VV $_{Gf}$ - α CTLA4의 상승작용을 조사하였다. 이전 데이터는, 임상적으로 관련된 항PD-1(10mg/kg), 항CTLA-4(10mg/kg) 또는 이들의 조합의 전신 투여를 포함하여 B16 종양이 ICB 요법에 불응성임을 입증하였다(도 14).

촉진할 수 있는 큰 종양은 항체를 인코딩하는 바이러스를 주입하지만, 작거나 감지할 수 없는 전이 병변은 주입할 수 없는 임상 상황을 모방하기 위해, 본 발명자들은 동물이 하나의 "큰" 종양과 하나의 "작은" 종양을 가지고 있고, 큰 종양에만 VV $_{Gf}$ - α CTLA4를 주입하는 쌍둥이 종양 B16/C57BL6 모델을 확립하였다. 항-PD-1에 대한 내성은 10mg/kg의 최대 효과적인 용량으로 전신 치료 후 종양 성장 억제 또는 생존 이점의 부족에 의해 확인되었다(도 8a).

이전에 관찰된 바와 같이, VV $_{Gf}$ - α CTLA4를 사용한 단일 제제 치료는 일차 주입된 종양의 종양 성장을 유의하게 감소시켰다(도 4 및 도 8b). 그러나, 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4는 주입되지 않은 종양의 성장의 약간의 지연만을 유도하였고(도 8b), 이는 동물 생존으로 이어지지 않았다(도 8a). 놀랍게도, 단일 제제 또는 항-PD-1 및 항-CTLA-4 치료와 대조적으로, 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4 및 전신 항-PD-1과의 병용 치료는 주입 및 주입되지 않은 종양 성장을 상당히 억제하여, 이 ICB 치료 내성 "차가운" 암 모델에서 치료된 동물의 ~20%를 초래했다(도 8a).

VV $_{Gf}$ - α CTLA4가 차가운, ICB 내성, 염증성 종양, ICB 반응성, 표현형으로 전환할 수 있는 것과 더욱 일치하며, VV $_{Gf}$ - α CTLA4와의 결합 치료(단, 항PD-1 단독 치료는 아님)는 B16 종양으로 T 세포의 강한 유입을 유도했으며, 이는 염증성 CT26 종양과 비교하여 유사하게 조밀한 T 세포가 풍부해졌다(도 14c).

이들은 합성 A20 종양을 이식한 BALB/c 마우스에서 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4 및 전신 항PD-1의 결합된 상승작용을 확인하였다. 이 모델은 전체 치료 복강내 투여(10mg/kg)로 동물의 ~20%가 치료되는 항PD-1에 반-반응성인 것으로 나타났다(도 8c). 근육내 VV $_{Gf}$ - α CTLA4를 사용한 최적 치료 용량은 완전히 보호적이었지만(10/10 동물 치료,

도 4), 최적 용량의 1/100을 사용한 차선택 치료는 유의하지 않은 종양 성장 억제를 나타냈고 생존 이점을 나타내지 않았다. 치료용 복강내 항-PD-1 및 보조치료용 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 를 결합했을 때, 대부분의 동물 7/10이 치료되었다(도 8c).

고찰

본 발명자들은 종양용해바이러스 인코딩된 Treg-고갈 $\alpha CTLA-4$ 의 종양 내 투여가 승인된 전신 $\alpha CTLA-4$ 요법에 비해 더 강하고 더 광범위한 항종양 활성을 가지지만, 종양에 제한된 노출 특성을 통해 안전하고 내약성이 우수한 것으로 나타난다는 생체내 개념 증명을 제공한다. 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 는 전신 재조합 $\alpha CTLA-4$ 와 비교하여 종양 특이적 $CD8^+$ T 세포의 더 강한 확장을 유도했으며, 전신 $\alpha CTLA-4$ 및 $\alpha PD-1$ 의 임상적으로 관련된 투여에 내성이 있는 면역 침투 “차가운” 합성 마우스 종양 모델에서 항종양 활성을 가졌다. 놀랍게도, 본 발명자들의 관찰은 종양용해바이러스 $\alpha CTLA-4$ 에 의해 유도된 강력한 전신 항종양 면역이 주입된 종양의 “면역 점화” 효과로부터 엄격하게 파생되었음을 시사한다; 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 는 원위의 비주입 종양에 대한 바이러스 확산 또는 항체 노출과 관련이 없었지만, 오히려 종양-제한 CTLA-4 수용체 포화 및 Treg 고갈을 달성하였다.

이러한 관찰은 근육내 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 의 예상 임상 효능과 내약성 모두에 중요한 영향을 미친다. 효능 관점에서, 이들은 종양용해바이러스-인코딩된 $\alpha CTLA-4$ 의 국소 투여가 이용가능한 것(이필리무맙) 및 Treg-고갈 최적화(문헌[Arce Vargas, Furness et al. 2018]) 또는 “마스크”(문헌[Gutierrez, Long et al. 2020]), 전신 $\alpha CTLA-4$ 항체 요법뿐만 아니라 이전에 설명된 비-Treg 고갈 최적화 $\alpha CTLA-4$ 를 인코딩하는 종양용해바이러스 접근법과 비교하여 더 큰 치료 이점을 제공할 수 있음을 입증한다(문헌[Aroldi, Sacco et al. 2020]). 기계적 수준에서 $VV_{GM}-\alpha CTLA4$ 유도 $Fc\gamma R$ -의존성 Treg 고갈 및 $cDC1^+$ 항원 교차-제시는 관찰된 강력한 $CD8^+$ T 세포 확장과 $\alpha PD-1$ 과의 상승작용을 모두 바탕으로 차가운 종양을 거부할 가능성이 있다. 내인성 항종양 면역 반응의 유도(문헌[Hildner, et al. 2008]) 및 전신 체크포인트 차단 요법의 효능을 매개하는 것 외에도(문헌[Gubin, Zhang et al. 2014, Salmon, Idoyaga et al. 2016, Garriss, Arlauccas et al. 2018]), $cDC1$ 은 종양 내 $CD8^+$ TIL의 증식 반응을 촉진하고, $TCF1^+$ 줄기 유사 전구체 풀을 확장하며, $\alpha PD-1$ 치료 중 $TIM3^+$ 말단 이펙터의 생성을 유도한다(문헌[Mao, et al. 2021]).

유사하게, IL-2R 및 CTLA-4와 같은 공동자극 또는 공동억제 수용체에 대한 mAb로 달성된 Treg 고갈은 $CD8^+$ 이펙터 기능을 촉진하고 $\alpha PD-1$ 과 상승작용을 낼 수 있다(문헌[Wei, et al. 2019, Solomon, et al. 2020]). Treg를 감소시키고 항종양 $CD8^+$ T 세포를 확장시키는 “이중 활성화” 면역 조절 항체의 개발과 관련하여 축적된 데이터는 표적 생물학, 이펙터 $CD8^+$ T 세포 미세조정 강화 및 Treg-고갈 특성 및 전달 계획의 중요성을 보여준다. 예를 들어, Treg를 고갈시키지만 중요한(IL-2 매개) 성장 생존 신호의 $CD8^+$ 이펙터 T 세포를 굵기지 않는 IL-2R에 대한 $Fc\gamma R$ -능력 있는 비-리간드 차단 항체는 리간드 차단 $\alpha IL-2R$ 항체에 비해 암 치료에서 우수한 치료 가능성을 갖는다는 것이 최근 입증되었다(문헌[Solomon, et al. 2020]).

유사하게, 그러나 상이하게, 본 발명자들은 4-1BB에 대한 항체가 항체 아이소타입 스위칭($Fc\gamma R$ -결속 변경)에 의해 Tregs를 고갈시키거나 이펙터 T 세포 확장을 촉진하기 위해 만들어질 수 있지만, 두 메커니즘을 이용하는 것은 순차적 투여 또는 힌지-엔지니어링을 필요로 한다고 최근에 보고하였다(문헌[Buchan et al., 2018]). 종양용해성 바이러스 감염의 맥락에서 본원에 기재된 바와 같이, 주입된 종양에 대한 Treg 고갈-향상된 기능-차단 항-CTLA-4의 공간적 제한은 단독으로 또는 체크포인트 차단 요법을 상승작용 차단 요법과 조합하여 사용되는 경우, 면역 조절 항-CTLA-4 항체의 최대 치료 활성을 이용하기 위해 특히 유망한 접근법인 것으로 보인다.

여러 관찰은 종양 국소 치료를 위해 항 CTLA-4에서 Treg-고갈을 최적화하는 것을 지원한다. 첫째, 독립적인 연구에 따르면 항 CTLA-4의 치료 효능은 Treg-고갈에 의존하며 상관관계가 있다(문헌[Arce Vargas et al., 2018; Simpson et al., 2013]). 본원은 Treg-고갈 항-CTLA-4 클론의 치료 활성에 대한 데이터를 제시하였으며, 이는 $Fc\gamma R$ -전위(Treg 고갈) 항체 Fc-형식에서 강한 치료 효과를 나타냈고, 이의 $Fc\gamma R$ -결핍(비-고갈) 대응물과 비교한 속도가 이러한 개념을 뒷받침한다. 둘째, 이필리무맙으로 치료된 흑색종 환자의 임상 결과는 최근에 $Fc\gamma R$ -결합 및 Treg 고갈과 상관관계가 있는 것으로 보고되었지만, 본 발명자들로부터의 데이터는 이필리무맙이 종양 내 관련 수준의 CTLA-4를 발현하는 인간 Treg 세포에 대해 본원에서 벡터화된 항-CTLA-4 항체 4-E03에 비해 제

한된 고갈 활성을 제시하였음을 시사한다. 또한, 이필리무맙(표시 및 요법에 따라 1mg/kg 내지 3mg/kg)의 임상적인 허용 용량은 서브-포화 CTLA-4 수용체 점유 및 차신 효과(문헌[Ribas et al., 2005], [Bertrand et al., 2015])와 연관되어 있지만, 본 발명자들의 데이터는 종양 세포 붕괴성 백터화 및 근육내 투여가 명백하게 안전한 방식으로 -Treg-고갈이 강화된 항-CTLA-4에도 불구하고 -치료적으로 최적의 노출(지속적인 CTLA-4 수용체 포화)을 생성할 수 있음을 입증한다. 마지막으로, Treg-고갈 강화 및 체크포인트 차단 “이중 활성” α CTLA-4 항체의 백터화를 지원하는 항체-매개 CTLA-4 차단은 최근 종양-특이적 CD8⁺ T 세포 반응을 향상시키는 데 있어 FcγR-의존적 고갈과 상승작용이 있는 것으로 나타났다. CTLA-4의 항체 차단은 기능적으로 종양내 Treg를 불안정하게 하고 B7 리간드에 대한 변경된 해당과정 및 경쟁을 포함하는 과정을 통해 B7:CD28 공동자극 및 항종양 CD8⁺ T 이펙터 기능을 촉진하였다(문헌[Zappasodi, et al. 2021]).

전체 치료 투여가 종양-제한 항-CTLA-4 노출을 달성했다는 사실은 FoxP3- DTR 마우스 모델(문헌[Kim et al., 2007])에서 관찰된 것과 같은 지속적인 전신 Treg-결핍과 관련된 심각한 독성이 발현될 가능성이 낮다는 것을 나타낸다. 유사하게, 항-CTLA-4 체크포인트 차단 효과가 종양-항원 특이성을 갖는 TIL로 제한되기 때문에, 전신 항-CTLA-4와 관련된 뜻밖의 자가-반응성은 최소화되어야 한다. 대조적으로, CTLA-4의 잘 문서화된 중심 면역 체크포인트 특성과 일치하지만(문헌[Chambers et al., 1996; Leach et al., 1996]), 전신 투여, 즉 전신 항체 노출과 연관된 항-CTLA-4 부작용은 심각한 자가면역 특성일 수 있고, 치명적 결과를 초래할 수 있다(문헌[Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995]).

따라서, 항-CTLA-4의 효능 및 내약성은 지금까지 항-CTLA-4 기반 요법의 전체 치료 용량 사용을 배제하며 연결되고 용량-의존적인 것으로 간주되었지만, 연구 결과는 αCTLA-4를 고갈시키는 백터화된 Treg의 공간적 제한이 이러한 현재 한계를 극복(효능 및 내약성을 빼어냄)할 수 있음을 강력하게 시사한다.

참고문헌

1. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.
2. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34.
3. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-54.
4. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, and Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell.* 2017;168(4):707-23.
5. Chen DS, and Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10.
6. Gajewski TF, Schreiber H, and Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014-22.
7. Wagner J, Wickman E, DeRenzo C, and Gottschalk S. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? *Mol Ther.* 2020;28(11):2320-39.
8. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2017;170(6):1109-19 e10.
9. Wei SC, Sharma R, Anang NAS, Levine JH, Zhao Y, Mancuso JJ, et al. Negative Co-stimulation Constrains T Cell Differentiation by Imposing Boundaries on Possible Cell States. *Immunity.* 2019;50(4):1084-98.e10.
10. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E, et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell.* 2018;33(4):649-63 e4.
11. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and

- ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006-17.
12. Bertrand A, Kostine M, Barnetche T, Truchetet ME, and Schaeffer T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2015;13:211.
13. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, and Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3(5):541-7.
14. Marabelle A, Kohrt H, and Levy R. Intratumoral anti-CTLA-4 therapy: enhancing efficacy while avoiding toxicity. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5261-3.
15. Marabelle A, Kohrt H, Sagiv-Barfi I, Ajami B, Axtell RC, Zhou G, et al. Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2447-63.
16. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science.* 1995;270(5238):985-8.
17. Leach DR, Krummel MF, and Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996;271(5256):1734-6.
18. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, and Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med.* 2009;206(8):1717-25.
19. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med.* 2013;210(9):1695-710.
20. Ingram JR, Blomberg OS, Rashidian M, Ali L, Garforth S, Fedorov E, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(15):3912-7.
21. Veitonmaki N, Hansson M, Zhan F, Sundberg A, Lofstedt T, Ljungars A, et al. A human ICAM-1 antibody isolated by a function-first approach has potent macrophage-dependent antimyeloma activity in vivo. *Cancer Cell.* 2013;23(4):502-15.
22. Buchan SL, Dou L, Remer M, Booth SG, Dunn SN, Lai C, et al. Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function. *Immunity.* 2018.
23. Fransen MF, van der Sluis TC, Ossendorp F, Arens R, and Melief CJ. Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8+ T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5381-9.
24. Bommarreddy PK, Shettigar M, and Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):498-513.
25. Foloppe J, Kempf J, Futin N, Kintz J, Cordier P, Pichon C, et al. The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in Nucleotide Metabolism. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;14:1-14.
26. Kleinpeter P, Fend L, Thioudellet C, Geist M, Sfrontato N, Koerper V, et al. Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody, a Fab and a scFv against programmed cell death -1 (PD-1) allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition. *Oncoimmunology.* 2016;5(10):e1220467.
27. Fend L, Yamazaki T, Remy C, Fahrner C, Gantzer M, Nourtier V, et al. Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of

Oncolytic Virotherapy. *Cancer Res.* 2017;77(15):4146-57.

28. Liu Z, Ravindranathan R, Kalinski P, Guo ZS, and Bartlett DL. Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy. *Nat Commun.* 2017;8:14754.

29. Marchand J-B, Semmrich M, Fend L, Tornberg U-C, Silvestre N, Frendéus B, et al. *Society of Immunotherapy 33rd Annual meeting*. National Harbour, MD: Journal of Cancer Therapy; 2018.

30. Grosso JF, and Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* 2013;13:5.

31. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(25):2780-8.

32. Chesney J, Puzanov I, Collichio F, Singh P, Milhem MM, Glaspy J, et al. Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(17):1658-67.

33. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, and Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(5):313-22.

34. DiLillo DJ, and Ravetch JV. Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect. *Cell.* 2015;161(5):1035-45.

35. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science.* 2008;322(5904):1097-100.

36. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature.* 2014;515(7528):577-81.

37. Nakagawa H, Sido JM, Reyes EE, Kiers V, Cantor H, and Kim HJ. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(22):6248-53.

38. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017;355(6332):1428-33.

39. Wei SC, Duffy CR, and Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1069-86.

40. Simon S, Voillet V, Vignard V, Wu Z, Dabrowski C, Jouand N, et al. PD-1 and TIGIT coexpression identifies a circulating CD8 T cell subset predictive of response to anti-PD-1 therapy. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2).

41. Galletti G, De Simone G, Mazza EMC, Puccio S, Mezzanotte C, Bi TM, et al. Two subsets of stem-like CD8(+) memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans. *Nat Immunol.* 2020;21(12):1552-62.

42. Galon J, and Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(3):197-218.

43. Gutierrez M, Long GV, Friedman CF, Richards DA, Corr B, Bastos BR, et al. Anti-CTLA-4 probody BMS-986249 alone or in combination with nivolumab in patients with advanced cancers: Initial phase I results. *Journal of Clinical Oncology.* 2020;38(15_suppl):3058-.

44. Aroldi F, Sacco J, Harrington K, Olsson-Brown A, Nanclares P, Menezes L, et al. 421-Initial

results of a phase 1 trial of RP2, a first in class, enhanced potency, anti-CTLA-4 antibody expressing, oncolytic HSV as single agent and combined with nivolumab in patients with solid tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2020;8(Suppl 3):A256-A7.

45. Garriss CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN-gamma and IL-12. *Immunity*. 2018;49(6):1148-61 e7.

46. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 2016;44(4):924-38.

47. Mao T, Song E, and Iwasaki A. PD-1 blockade-driven anti-tumor CD8+ T cell immunity requires XCR1+ dendritic cells. *bioRxiv*. 2021.

48. Solomon I, Amann M, Goubier A, Vargas FA, Zervas D, Qing C, et al. CD25-Treg-depleting antibodies preserving IL-2 signaling on effector T cells enhance effector activation and antitumor immunity. *Nat Cancer*. 2020;1(12):1153-66.

49. Wei SC, Anang NAS, Sharma R, Andrews MC, Reuben A, Levine JH, et al. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(45):22699-709.

50. Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, Pavlov D, Bulanhagui CA, Millham R, et al. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol*. 2005;23(35):8968-77.

51. Zappasodi R, Serganova I, Cohen IJ, Maeda M, Shindo M, Senbabaoglu Y, et al. CTLA-4 blockade drives loss of Treg stability in glycolysis-low tumours. *Nature*. 2021;591(7851):652-8.

52. Kim JM, Rasmussen JP, and Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007;8(2):191-7.

53. Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, Hurwitz A, Sullivan TJ, Fournier S, et al. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev*. 1996;153:27-46.

54. Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, and Weiner LM. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol*. 2008;180(9):6392-401.

55. Chen T, Hoffmann K, Ostman S, Sandberg AS, and Olsson O. Identification of gliadin-binding peptides by phage display. *BMC Biotechnol*. 2011;11:16.

56. Huang AY, Gulden PH, Woods AS, Thomas MC, Tong CD, Wang W, et al. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9730-5.

57. Russell TA, and Tschärke DC. Strikingly poor CD8+ T-cell immunogenicity of vaccinia virus strain MVA in BALB/c mice. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(5):466-9.

58. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.

59. Smith T, Heger A, and Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*. 2017;27(3):491-9.

60. Anders S, Pyl PT, and Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166-9.

61. Love MI, Huber W, and Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-

seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.

62. Yu G, Wang LG, Han Y, and He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16(5):284-7.

63. Chan, W. M. and G. McFadden (2014). "Oncolytic Poxviruses." *Annu Rev Virol* **1**(1): 119-141.

64. Marino, N. et al. (2017). "Development of a versatile oncolytic virus platform for local intra-tumoural expression of therapeutic transgenes." *PLoS One* **12**(5): e0177810.

65. McDermott, D. F. et al. (2018). "Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma." *Nat Med* **24**(6): 749-757.

66. Mosely, S. I. et al. (2017). "Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery." *Cancer Immunol Res* **5**(1): 29-41.

67. Tumeh, P. C. et al. (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." *Nature* **515**(7528): 568-571.

68. Bruni, D. et al. (2020). "The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy." *Nature Rev Cancer* **20**: 662-680.

69. Galon, J. et al. (2006). "Type, density and location of immune cells within human colorectal tumours predict clinical outcome." *Science*. **313**: 1960-1964.

70. Fridman, W. H. et al. (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." *Nature Rev Cancer* **12**: 298-306.

71. Fridman, W. H. et al. (2017). "The immune contexture in cancer prognosis and treatment." *Nature Rev Clin. Oncol.* **14**: 717-334.

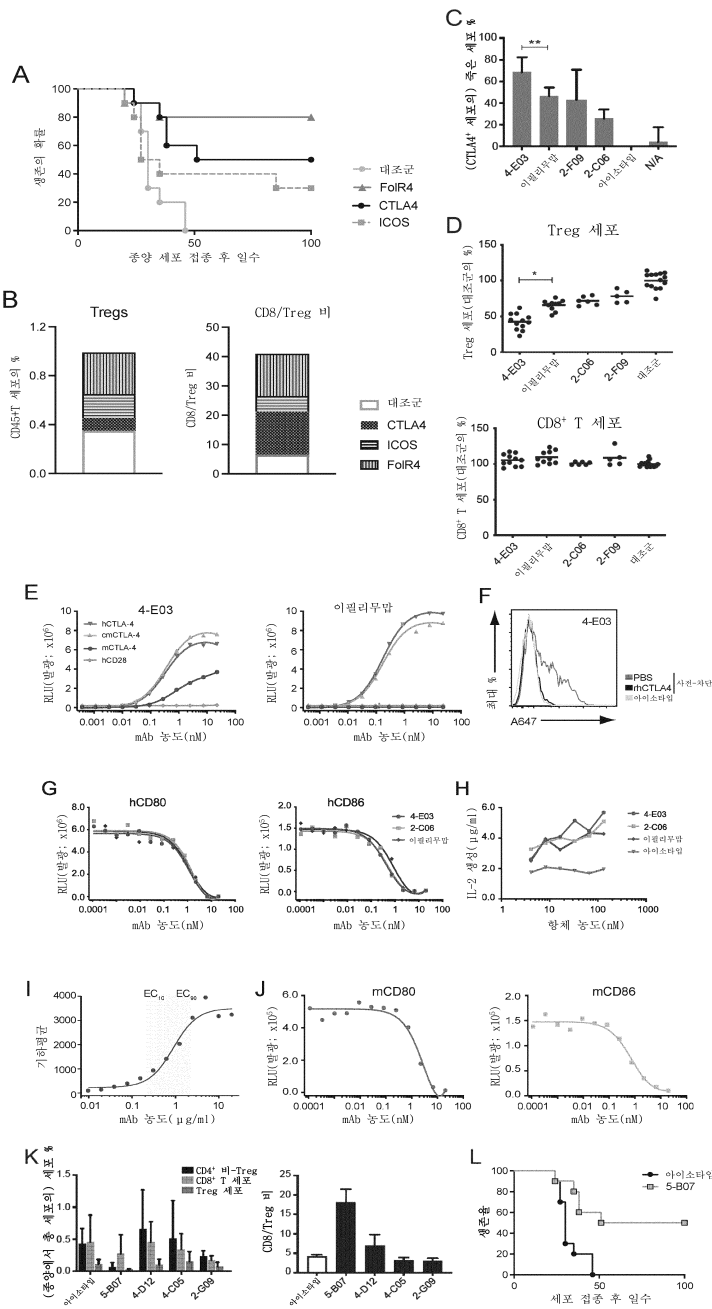
72. Hu, Z. et al. (2018). "Tumor-infiltrating CD45RO+ memory cells correlate with favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Dis.* **10**: 2089-2099.

73. Lanzi A. et al. (2020). "The consensus immunescore: toward a new classification of colorectal cancer" *OncoImmunology*, **9**:1-3.

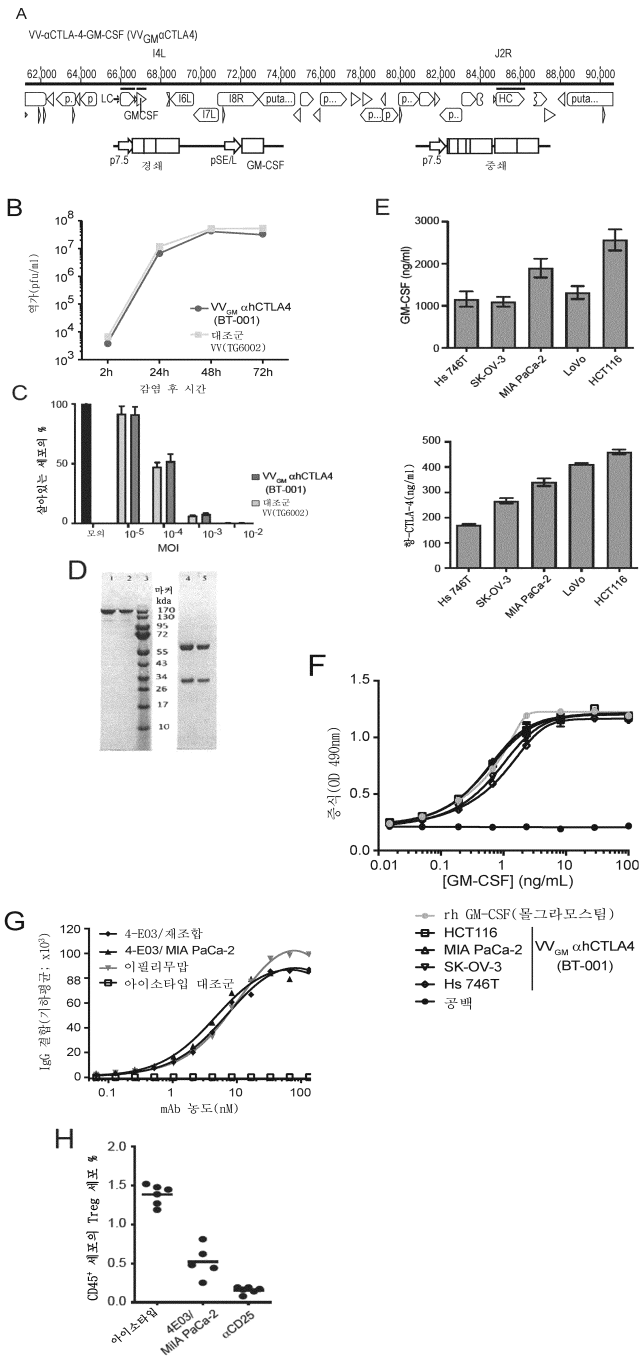
74. Angell, H. K. et al. (2020). "The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond." *Clinical Cancer Research* **26**: 332-339.

도면

도면1

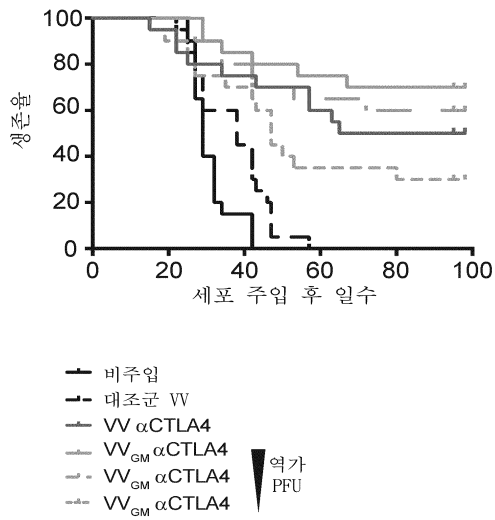


도면2

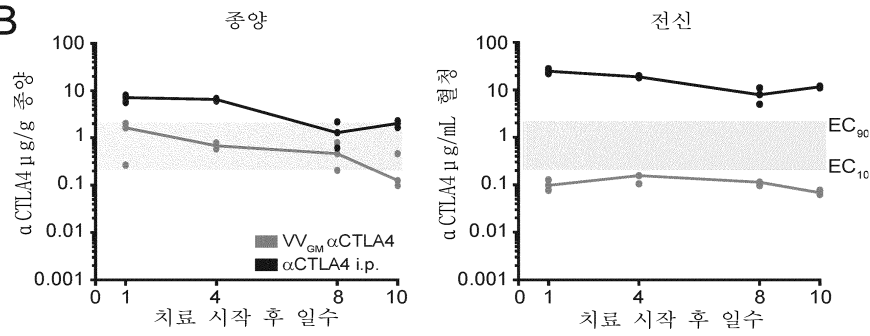


도면3

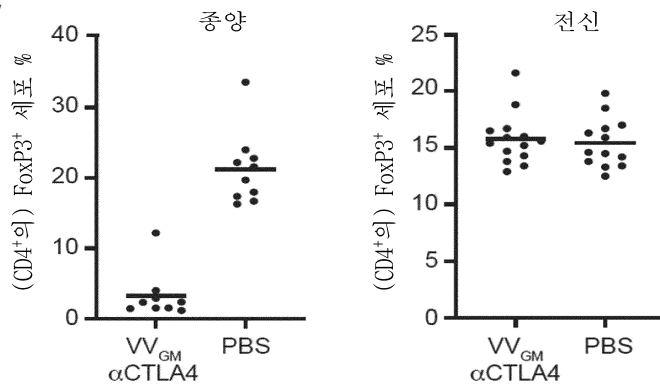
A



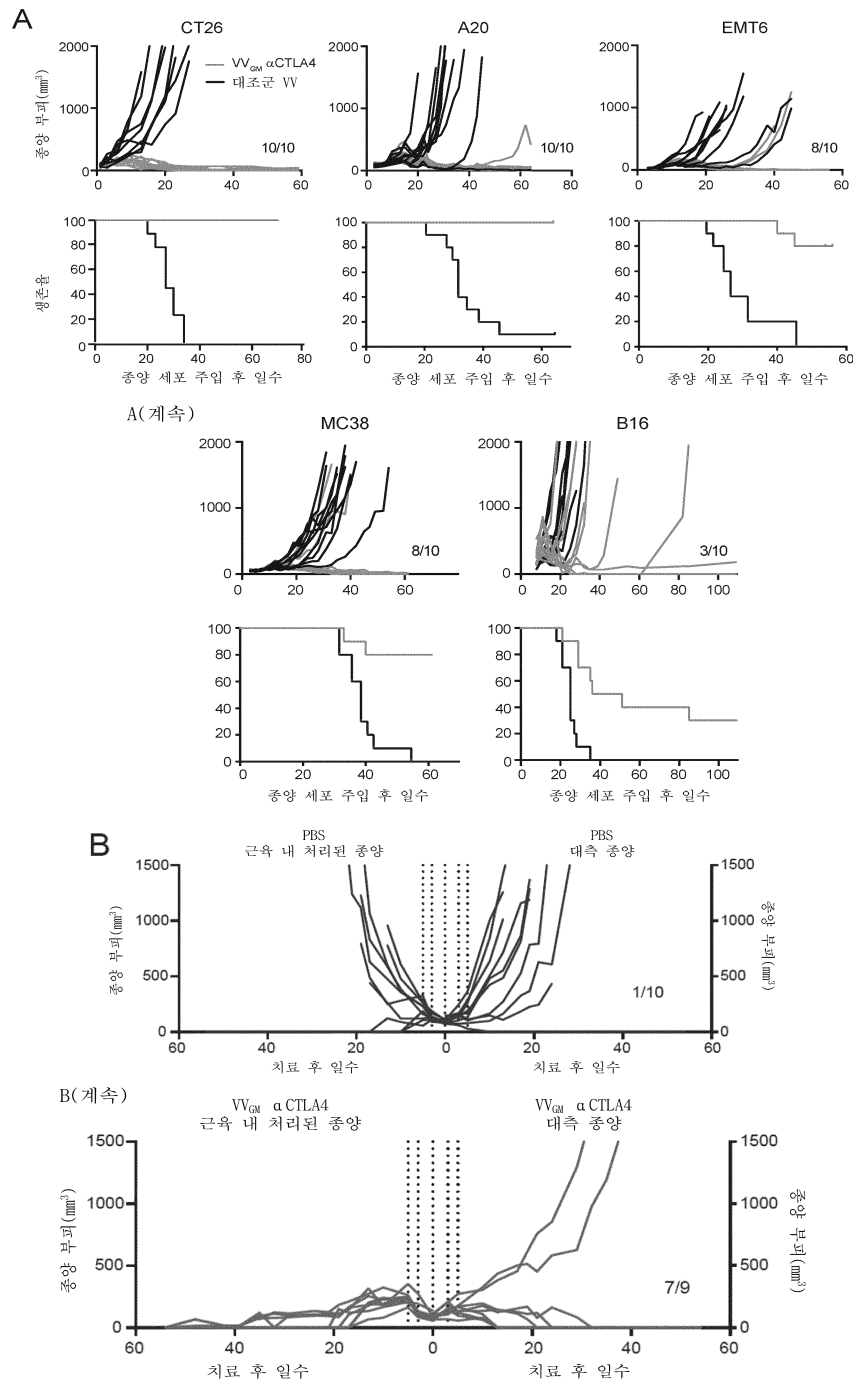
B



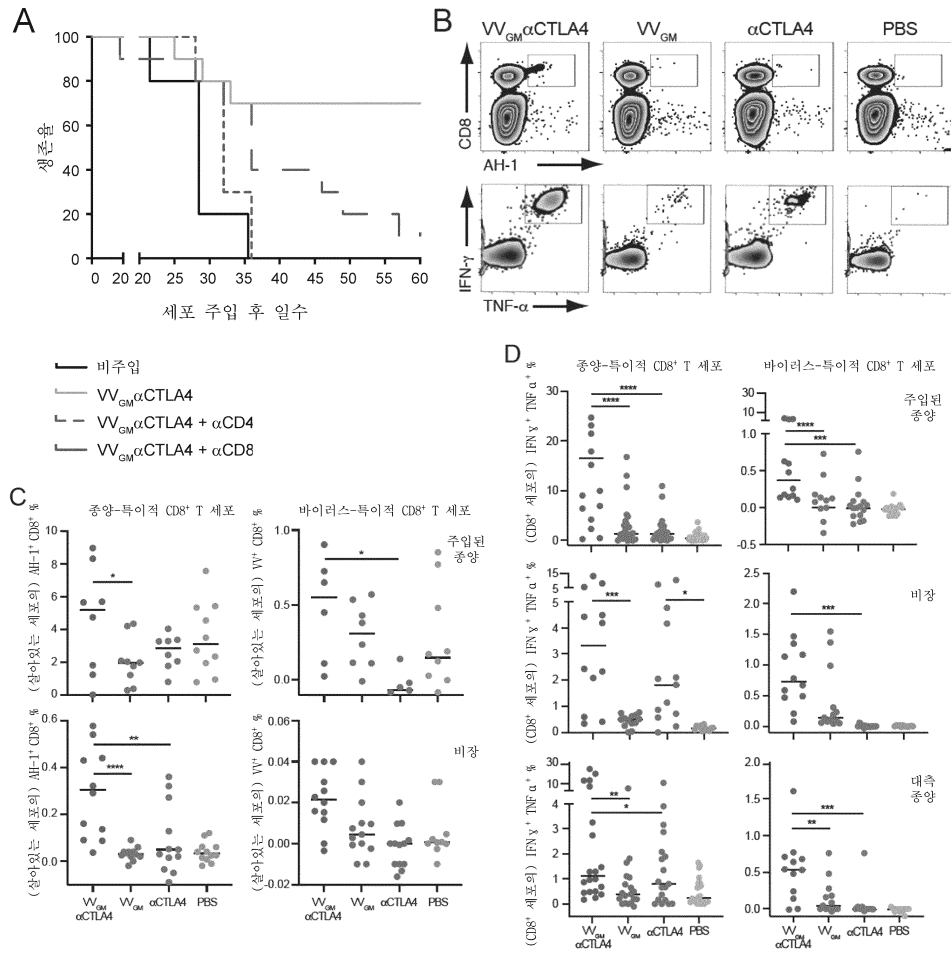
C



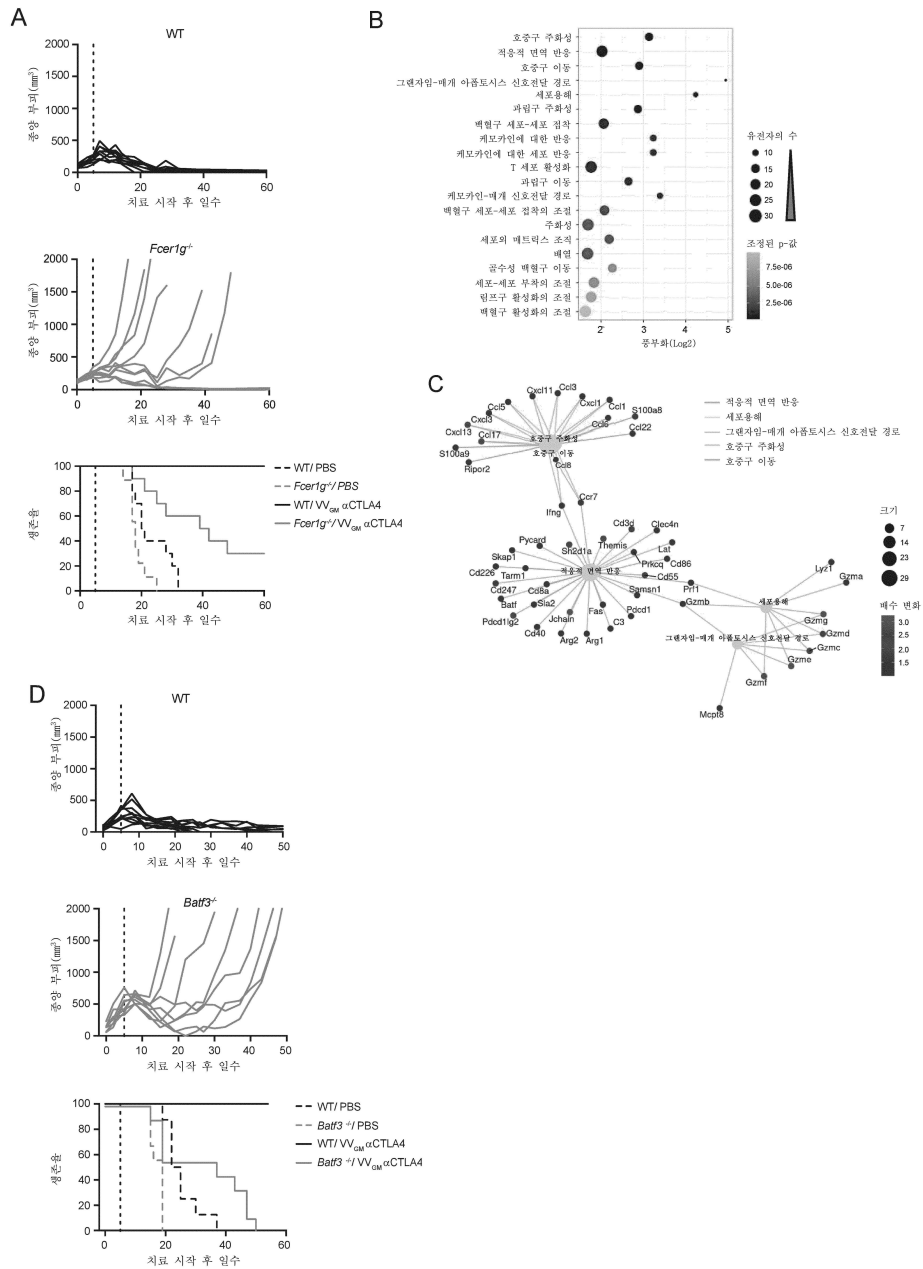
도면4



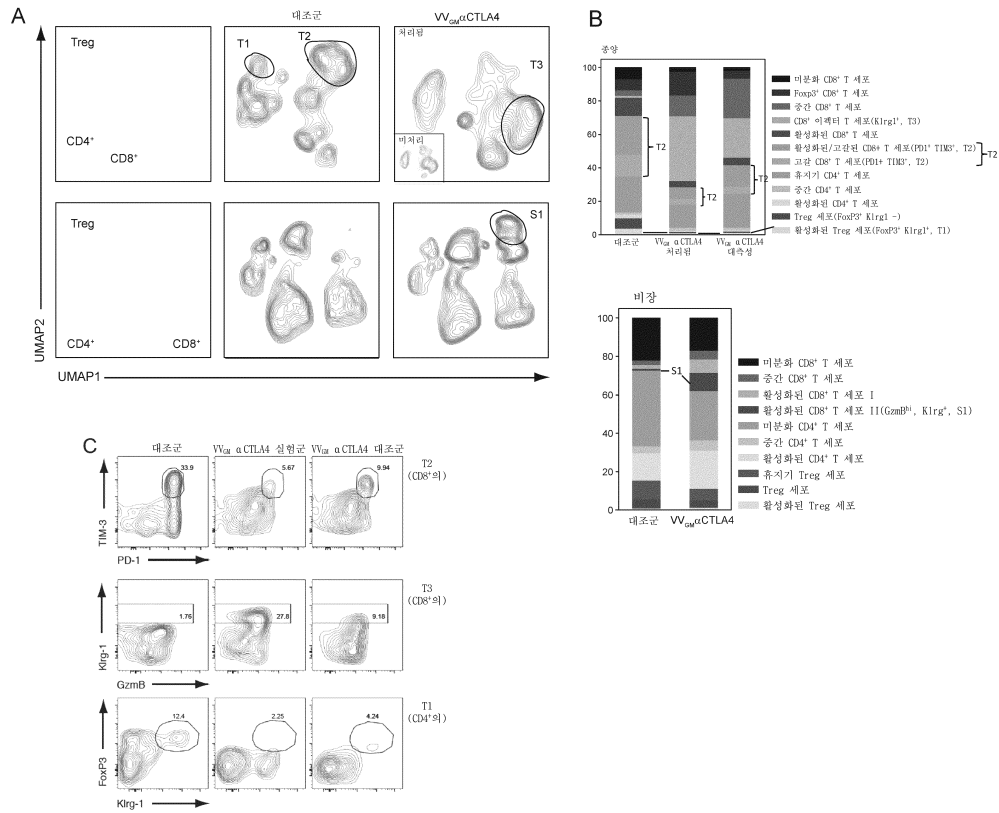
도면5



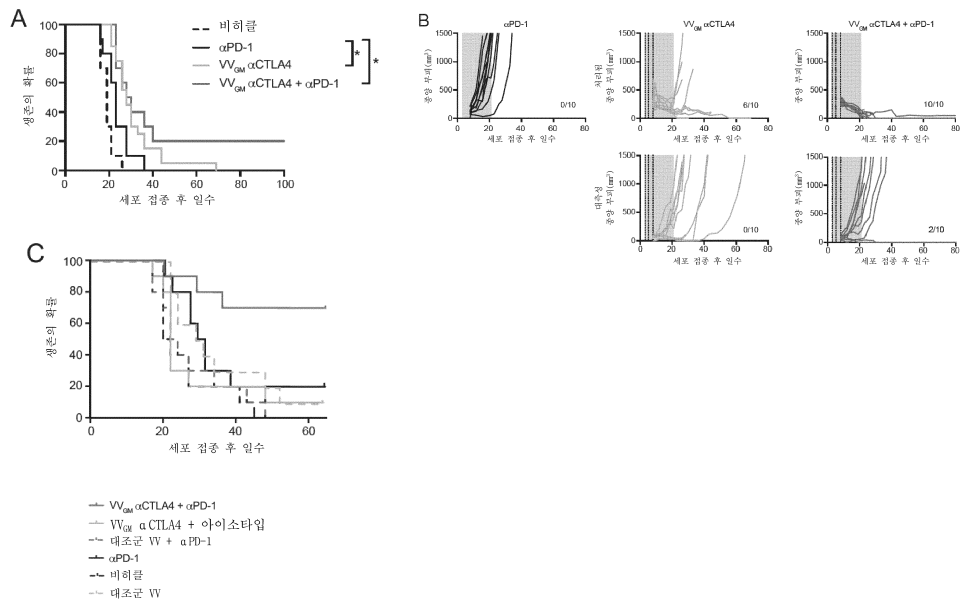
도면6



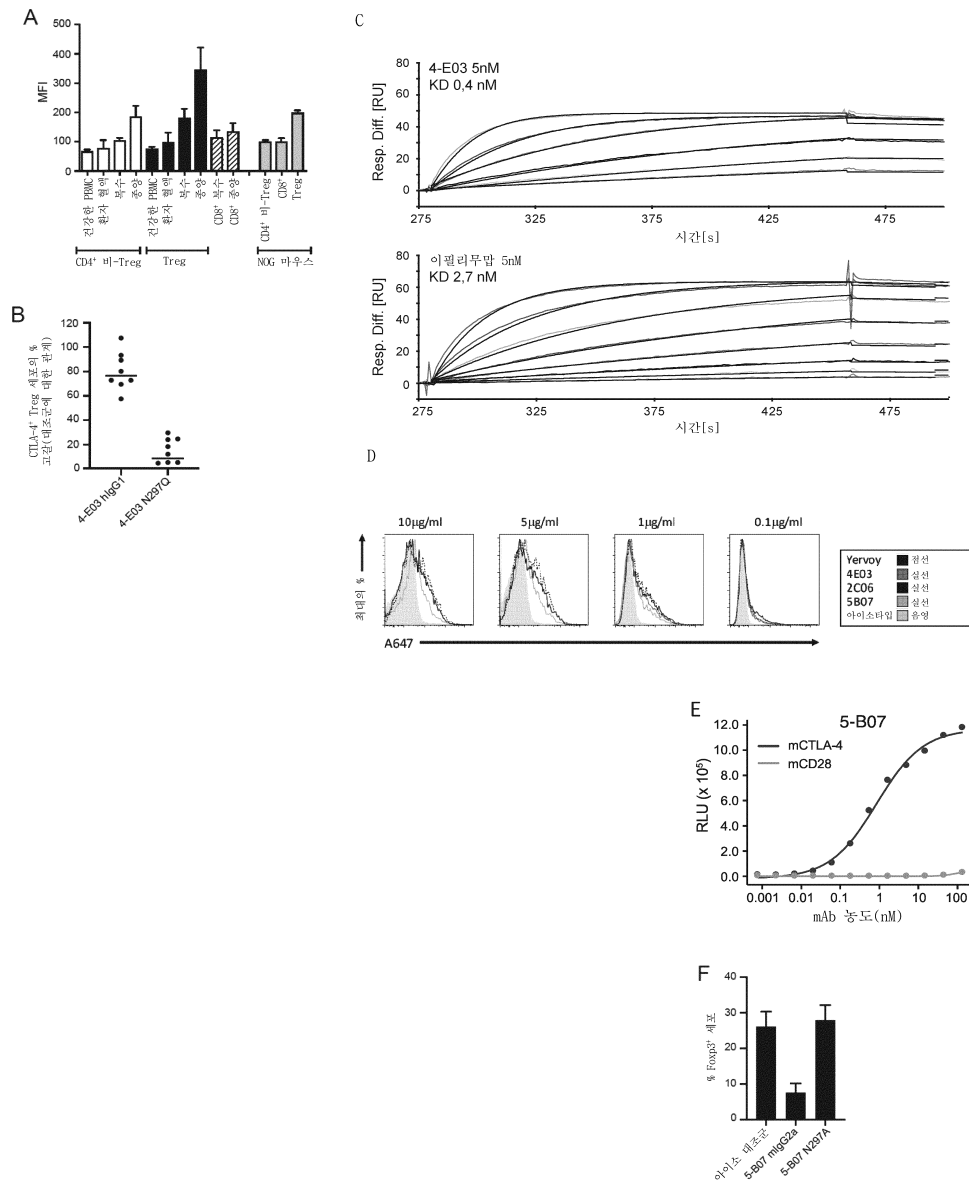
도면7



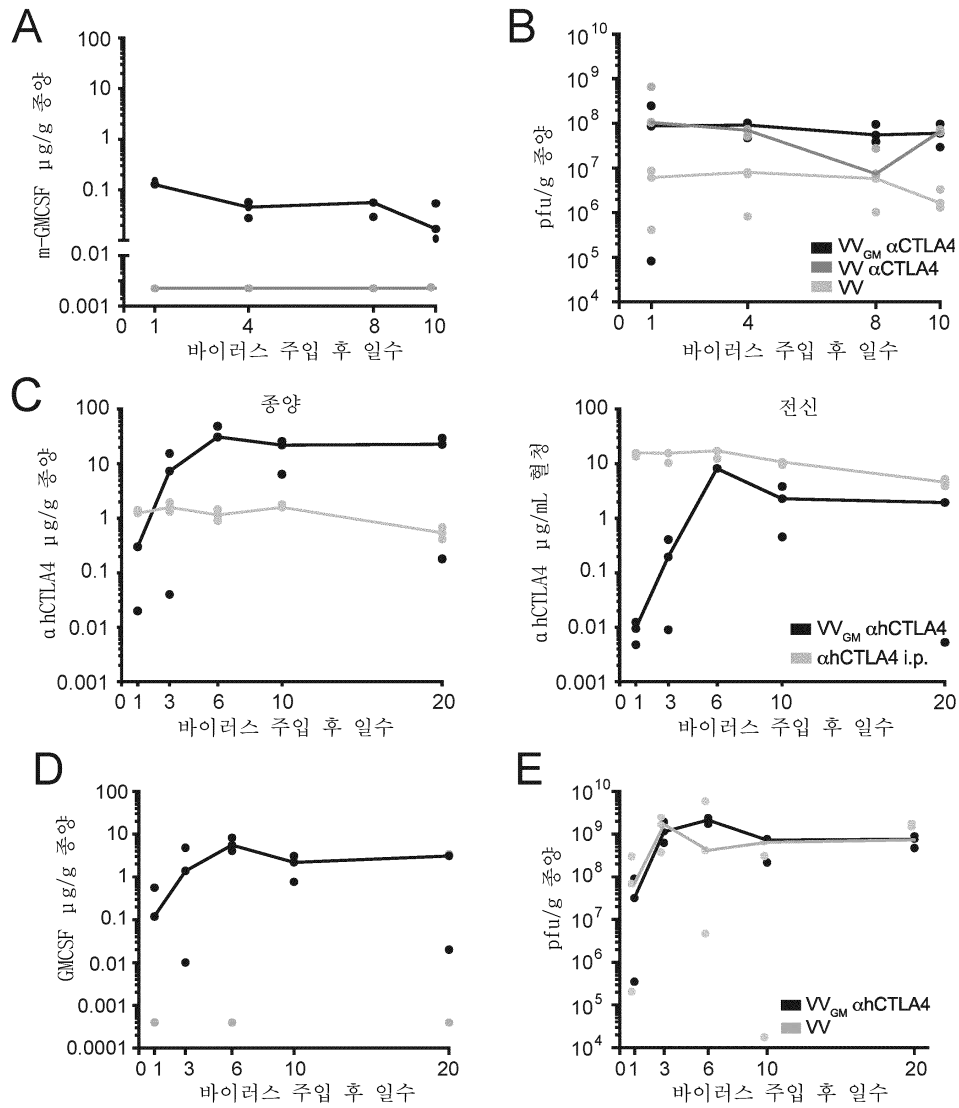
도면8



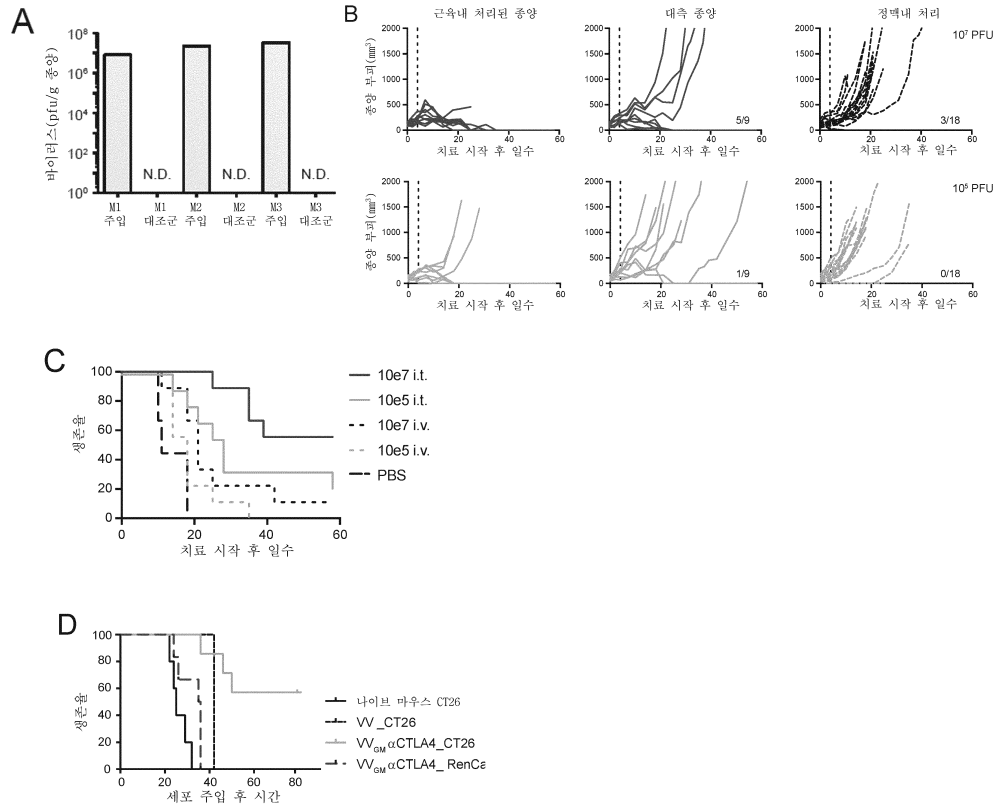
도면9



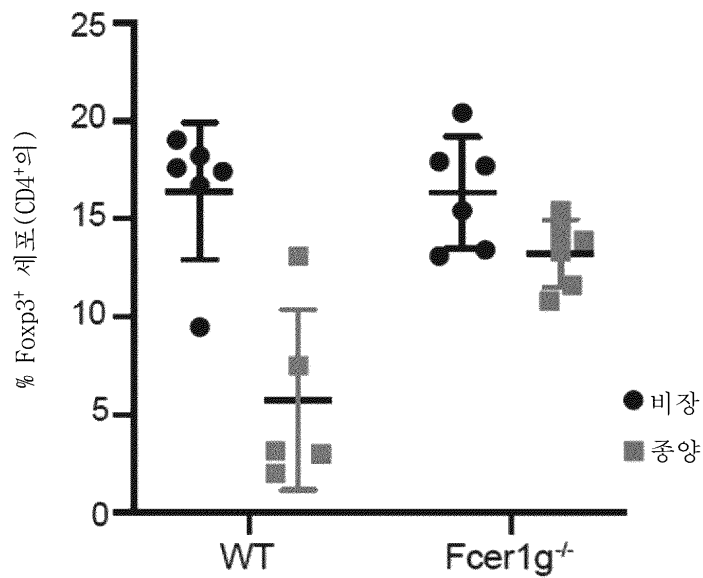
도면10



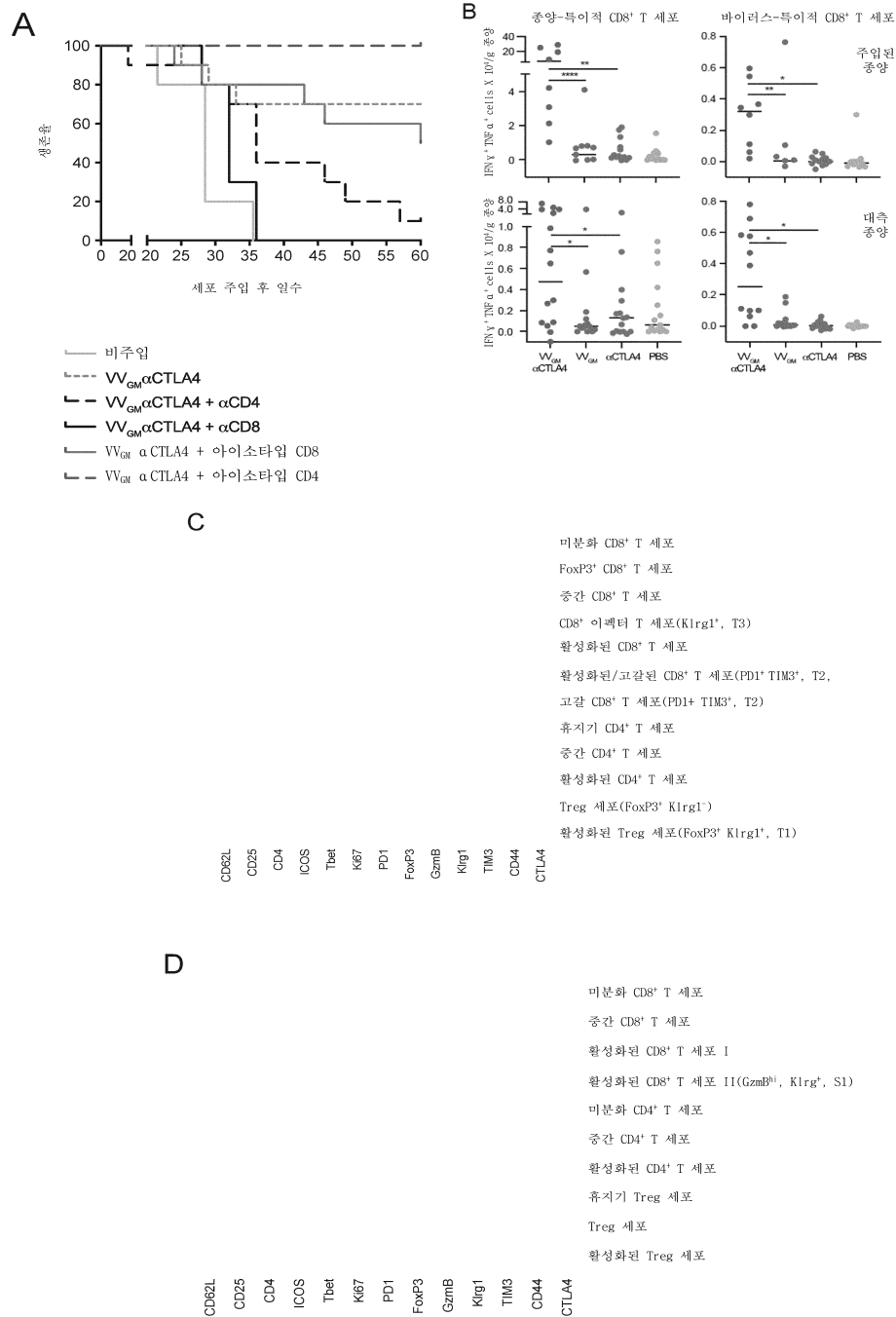
도면11



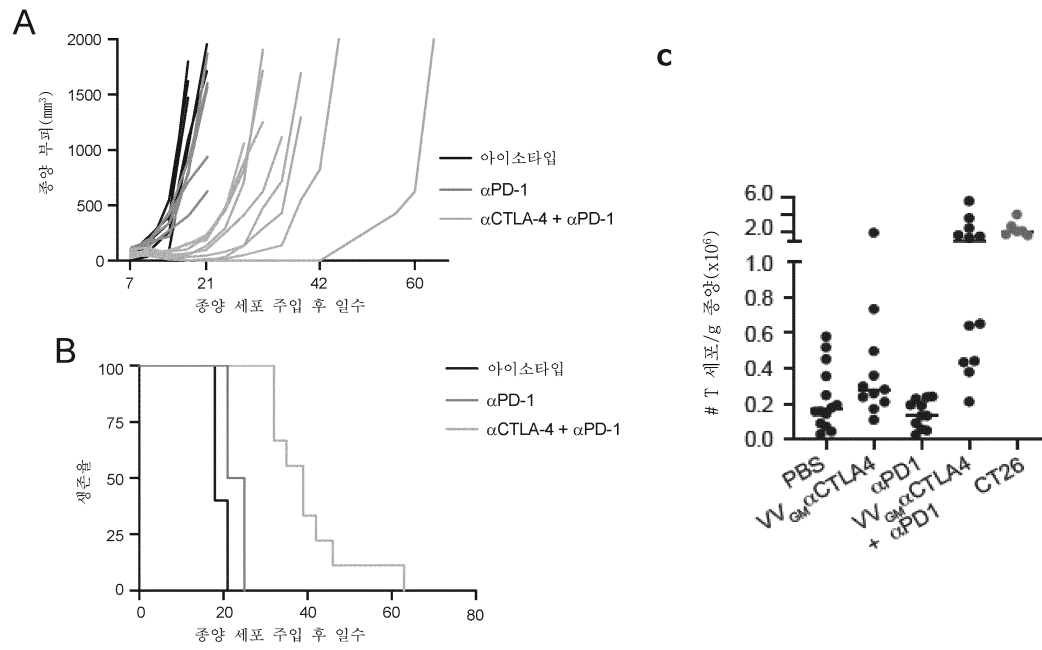
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.